

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

Высшее профессиональное образование

Ю. Т. Дьяков
А. В. Шнырева
А. Ю. Сергеев

ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИКУ ГРИБОВ

Учебное пособие



Естественные
науки

ВЫСШЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ

Ю. Т. ДЬЯКОВ, А. В. ШНЫРЕВА, А. Ю. СЕРГЕЕВ

ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИКУ ГРИБОВ

*Рекомендовано
Учебно-методическим объединением
по классическому университетскому образованию
в качестве учебного пособия для студентов,
обучающихся по направлению 020200 «Биология»
и биологическим специальностям*

УДК 58(075.8)
ББК 28.5я73
Д931

Рецензенты:

акад. РАН, проф. *С. В. Шестаков* (зав. кафедрой генетики биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова);
д-р биол. наук, проф. *С. В. Каменева* (биологический факультет Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова);
чл.-кор. РАН, проф. *И. А. Захаров-Гезехус* (заместитель директора Института общей генетики РАН)

Дьяков Ю.Т.

Д931 Введение в генетику грибов: Учеб. пособие для студ. высш. учеб. заведений / Ю.Т. Дьяков, А.В. Шнырева, А.Ю. Сергеев. — М.: Издательский центр «Академия», 2005. — 304 с.
ISBN 5-7695-2174-0

В пособии рассматривается строение грибного генома и его изменения в результате мутационного и рекомбинационного процессов; генетическая регуляция морфогенеза и жизненных циклов; эволюция систем размножения и роль гетерокариоза и вегетативной несовместимости в структуре грибных популяций; прикладные аспекты генетики грибов.

Для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлению «Биология» и биологическим специальностям.

УДК 58(075.8)
ББК 28.5я73

*Оригинал-макет данного издания является собственностью
Издательского центра «Академия», и его воспроизведение любым способом
без согласия правообладателя запрещается*

ISBN 5-7695-2174-0

© Дьяков Ю.Т., Шнырева А.В., Сергеев А.Ю., 2005
© Издательский центр «Академия», 2005

ПРЕДИСЛОВИЕ

Грибы представляют собой эколого-трофическую группу, в которую включают гетеротрофных эукариот с осмотротфным типом питания. В филогенетическом плане они образуют царство Истинные грибы (Mycota), а также входят в состав царств Stramenopila и Mухobiontae. Огромное число видов грибов (по прогнозам, может достигать 1,5 млн), богатый набор ферментов и других биологически активных веществ, позволивший им освоить разные субстраты, обеспечили большую роль, которую грибы играют в природе, а также в жизни и хозяйственной деятельности человека. Грибы составляют важнейший компонент гетеротрофного блока в круговороте углерода: через их тело проходит $\frac{2}{3}$ связанного углерода на Земле. Грибы-паразиты вызывают опасные болезни растений, животных и человека, а деструкторы органических материалов — биокоррозию древесных изделий, промышленных материалов, произведений искусства. Продукция разнообразных биологически активных веществ (ферментов, антибиотиков, фитогормонов и др.) выдвинула грибы на первый план среди организмов как объекты биотехнологии.

В связи с вышесказанным для специалиста-миколога особый интерес представляет изучение общей и частной генетики грибов. Это необходимо, во-первых, для понимания основополагающих вопросов теоретической микологии — филогении и таксономических связей, эволюционных и популяционных исследований, границ вида, генетического регулирования метаболизма и онтогенеза и пр., во-вторых, для исследований, имеющих прикладной характер, — генетики синтеза биологически активных веществ и генетических основ селекции полезных грибов, генетики вирулентности и устойчивости к противогрибным препаратам грибов, патогенных для растений, животных и человека. Поэтому для миколога, независимо от того, занимается ли он вопросами общей или прикладной микологии, чрезвычайно важно иметь некоторый набор знаний в области классической и молекулярной генетики и представления о возможности их использования в поставленной перед ученым исследовательской задаче. Одну сторону проблемы взаимодействия двух биологических дисциплин — микологии и генетики — можно назвать «генетика для грибов».

Другую сторону данной проблемы можно назвать «*грибы для генетики*».

Как известно, генетика занимается закономерностями и механизмами наследственности и изменчивости организмов. Наследственность обусловлена тонкой и сложной регуляцией метаболических процессов, записанных в геноме организма и реализующихся в процессе жизнедеятельности отдельных клеток, тканей и органов в онтогенезе. Изменчивость определяет различия между индивидуумами, слагающими популяции, популяциями, слагающими виды, видами, слагающими более крупные таксоны. Изменчивость дает материал для микроэволюции видов и макроэволюции всей биоты. Все это делает генетику фундаментальной наукой, изучающей наиболее общие свойства живой материи. Естественно, для изучения общих закономерностей, присущих всем организмам или хотя бы крупным таксонам, необходимы модельные объекты. Выбор генетических моделей обусловлен не такими свойствами, как практическая значимость объекта, частота его встречаемости и пр., а исключительно двумя свойствами: типичностью и удобством для генетических исследований. В этом плане грибы — удобные объекты для фундаментальных генетических исследований.

- Большинство грибов представляют собой микроорганизмы, хорошо растущие на относительно простых питательных средах, поэтому к ним можно применять удобные стандартные микробиологические методы (выращивание в строго контролируемых условиях, использование селективных сред и т. п.).

- В отличие от бактерий грибы — типичные эукариоты, имеющие настоящее ядро, разделение генетического материала по типу митоза и мейоза, митохондрии и другие структуры, характерные для клеток эукариот, поэтому установленные у грибов закономерности наследственности и изменчивости можно экстраполировать и на клетки других эукариотных организмов.

- Среди других эукариот грибы — одни из наиболее просто устроенных организмов. Геном многих грибов хотя и организован в хромосомах, но по размеру не намного превышает геном бактерий. Например, пекарские дрожжи имеют 15 хромосом, но каждая хромосома в среднем в 5 раз меньше «хромосомы» кишечной палочки и только в 4 раза больше ДНК бактериофага Т2. Маленькие геномы грибов облегчают изучение генетики этих организмов.

- Многие грибы в вегетативном состоянии гаплоидные, что облегчает получение рецессивных мутаций, не маскирующихся доминантными аллелями.

- У ряда грибов можно исследовать индивидуальные продукты мейоза, т. е. проводить тетрадный анализ, что значительно увеличивает возможности важного инструмента генетических иссле-

дований — гибридологического анализа. Тетралный анализ дал возможность установить новые для науки факты, приведшие к открытию молекулярных механизмов рекомбинации.

- В разных группах грибов обнаружено чрезвычайное разнообразие генетической и гормональной систем регуляции обменов генетической информации (гетерокариоз, гетероталлизм, моно- и диэцизм, димиксис и диафоромиксис). Грибы, вероятно, были полигоном, на котором природа испытывала и отбирала эти системы.

- Грибы представляют собой разнообразные экологические группы микроорганизмов. Например, среди грибов известны виды, находящиеся на разных этапах паразитической специализации по отношению к растениям и отчасти к животным. Это дает возможность исследовать генетические механизмы патогенности и взаимоотношений хозяина и паразита.

- Грибы широко распространены в различных природно-экологических и технологических сферах, что позволяет проводить сравнительные популяционные исследования.

Перечисленные свойства сделали грибы излюбленными объектами генетиков. Открытие Д. Бидлом и Е. Тейтумом биохимических мутантов *Neurospora crassa* заложило основы биохимической генетики. Дрожжи, как никакой другой эукариотный организм, дали много для изучения генов, обслуживающих внутриклеточные процессы (housekeeping genes), и генетики митохондрий. С *Aspergillus nidulans* связаны открытие и изучение парасексуального процесса. Эти примеры можно продолжить.

Поскольку для изучения фундаментальных вопросов генетики главное требование к объекту — не его практическая ценность, а удобство для решения поставленной задачи, генетика грибов долгие годы развивалась с использованием ограниченного числа видов. Среди них доминировал классический треугольник: *Saccharomyces* — *Neurospora* — *Aspergillus*. Это создавало противоречия между требованиями микологов к генетике — изучение многих видов, представляющих теоретический и практический интерес для микологии, и требованиями генетиков к микологии — выбор модельных объектов. Среди 11 видов грибов, описанных в 1-м томе «Справочника по генетике» (1972), только два вида — аскомицет *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) и базидиомицет *Ustilago maydis* (возбудитель распространенной болезни кукурузы) — вызывают интерес. Многие практически важные грибы (дейтеромицеты) лишены полового процесса, поэтому для их изучения был неприменим важнейший инструмент исследований — гибридологический анализ.

В конце XX в. положение в корне изменилось в связи с возникновением нового направления генетики — *геномики*. Появились технологии, позволяющие изолировать любые гены из лю-

бых организмов, секвенировать их и изучать структуры кодируемых белков, что поменяло основную парадигму генетического анализа. Вместо направления «от признака к кодирующему гену» наметилось направление «от гена к белку и признаку». Молекулярные технологии позволили вовлечь в генетический анализ организмы, ранее недоступные для него вследствие неспособности формировать гибридное потомство. В сферу генетических исследований удалось ввести агамные и аспорогенные виды, облигатно-симбиотрофные и облигатно-паразитические. Геномика разрешила противоречия между двумя направлениями взаимоотношений микологии и генетики. Началось взаимное оплодотворение данных направлений. Это, с одной стороны, упростило задачи, связанные с использованием для изложения затрагиваемых вопросов более широкого круга видов грибов, а с другой, потребовало привлекать данные молекулярной генетики, представляющие определенную сложность для традиционных микологов, которым, прежде всего, предназначена данная книга.

В англоязычной литературе есть несколько превосходных учебников, посвященных генетике грибов:

J. H. Burnett. Mycogenetics (1975); K. Esser, R. Kuenen. Genetics of Fungi (1967); J. R. S. Fincham, P. R. Day, A. Radford. Fungal Genetics (1979).

Хотя некоторые разделы этих книг устарели, знакомство с ними очень полезно. Имеется также множество новых обзоров по отдельным аспектам генетики грибов.

На русском языке для изучения отдельных аспектов генетики грибов можно рекомендовать следующие книги:

С. И. Алиханян. Селекция промышленных микроорганизмов (1968); Ю. Т. Дьяков. Популяционная биология фитопатогенных грибов (1998);

Ю. Т. Дьяков, А. В. Долгова. Вегетативная несовместимость фитопатогенных грибов (1995);

И. А. Захаров. Курс генетики микроорганизмов (1978);

И. А. Захаров, К. В. Квитко. Генетика микроорганизмов (1967);

И. А. Захаров, Б. П. Мацелюх. Генетические карты микроорганизмов (1989);

И. А. Захаров и др. Мутационный процесс у грибов (1980);

С. Г. Инге-Вечтомов, Т. С. Карпова. Частная генетика дрожжей сахаромисетов (1993);

В. В. Кушев. Механизмы генетической рекомбинации (1971);

М. М. Левитин. Генетические основы изменчивости фитопатогенных грибов (1986);

Сборник методик по генетике дрожжей сахаромисетов (1984);

а также обзорные статьи:

Д. А. Горденин, В. В. Кваша. Внутригенная рекомбинация и методы построения генных карт у грибов // Исследования по генетике. Т. 7;

С. Г. Инге-Вечтомов. Прионы дрожжей и центральная догма молекулярной биологии // Вестник РАН, 2000. № 4;

К. В. Квитко. Относительная роль мутаций и отбора в микробных популяциях // Успехи современной генетики, 1974. Т. 5.

Предлагаемое учебное пособие — первое системное изложение вопросов генетики грибов на русском языке. В его основу положен курс генетики грибов, многие годы читаемый на кафедре микологии и альгологии биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова. Поскольку этот курс читается микологами и адресован студентам, специализирующимся по микологии, в нем основное внимание уделено не общим проблемам генетики, решаемым с помощью грибных моделей, а тому кругу вопросов, который был назван «генетикой для грибов». Книга состоит из четырех частей: I. Грибной геном и его изменения (мутационный процесс, рекомбинация); II. Генетическая регуляция онтогенеза; III. Некоторые вопросы генетики популяций и эволюции; IV. Прикладные аспекты генетики грибов.

А. В. Шныревой написаны главы первой части, *А. Ю. Сергеевым* — глава 10 «Генетика патогенности возбудителей микозов». Остальные разделы написал *Ю. Т. Дьяков*. Он же осуществил общее редактирование книги.

Авторы благодарны члену-корреспонденту РАН *И. А. Захарову-Гезехусу*, академику РАН *С. В. Шестакову* и профессору *С. В. Каменевой*, взявшим на себя труд по чтению и рецензированию рукописи и сделавшим ценные замечания содержательного и редакционного характера.

Все замечания и предложения, направленные на улучшение содержания книги, будут восприняты авторами с благодарностью.

ЧАСТЬ I

ГРИБНОЙ ГЕНОМ И ПУТИ ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ

Глава 1

СТРУКТУРА И ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ГРИБОВ

Все мы являемся свидетелями бурного развития отрасли биологической науки — *геномики*. К настоящему времени полностью секвенированы геномы более 10 видов грибов. Однако развитие современной генетики было бы невозможным без накопленного на протяжении последних 50 лет прошлого столетия багажа знаний, поэтому в данной главе авторы сочли необходимым наряду с последними открытиями в области генетики грибов представить исторический аспект развития этого направления.

В ходе эволюции у эукариот, в том числе у грибов, сформировался геном, который существенно отличается от генома прокариот. Клетка эукариот отличается от прокариотической тем, что ее наследственный аппарат сосредоточен в ядре, ограниченном от цитоплазмы ядерной мембраной. В первую очередь это отличие заключается в *избыточности генома*: содержание ДНК на одну эукариотическую клетку на 1—2 порядка выше, чем у прокариот. В бактериальном геноме гены почти непрерывно следуют один за другим вдоль всей молекулы ДНК, а в некоторых случаях даже перекрываются. Гены, кодирующие ферменты одного метаболического пути, связаны между собой и часто образуют целостную единицу транскрипции. В эволюции эукариот такой принцип экономии был не столь важен. Большую часть ДНК эукариот занимают некодирующие участки. В целом приблизительно только 20 % всего генома функционально значимо и транслируется в белковые последовательности. *Мозаичная структура* генома — вторая отличительная черта эукариот. Собственно ДНК эукариот распределена в ядре по нескольким хромосомам. Клеточные хромосомы содержат линейную дуплексную ДНК, хотя вдоль линейного остова встречаются двухцепочечные петли. С другой стороны, *геном компактен*, т.е. ДНК плотно упакована в хромосомы.

Геномом организма называют все его внутриклеточные структуры, способные к саморепликации и несущие ту или иную наследственную информацию. В грибной клетке к таким структурам относятся ядра (ядерный геном), митохондрии (митохондриальный геном), плазмиды.

Большой вклад в понимание организации генома эукариот, в том числе грибов, внесли работы 1960-х годов Р. Бриттена и Е. Дьюидсона, основанные на изучении *кинетики реассоциации ДНК*. Для такого анализа ДНК «плавят», т.е. под действием повышенных температур, превышающих точку плавления ДНК, двойную спираль ДНК заставляют диссоциировать на однонитчатые молекулы, а затем определяют скорость восстановления дуплексов, т.е. скорость реассоциации фрагментов ДНК (рис. 1). Понятно, что гомологичные участки ДНК реассоциируют быстрее. По скорости реассоциации ДНК эукариот гетерогенна: от очень медленно реассоциирующих фракций, что соответствует уникальным последовательностям генома, до очень быстро реассоциирующих фрагментов. С помощью кинетического анализа реассоциации денатурированной эукариотической ДНК было показано, что значительная ее часть ренатурирует гораздо быстрее, чем можно ожидать для уникальных последовательностей. Высокая скорость реассоциации говорит о том, что данная последовательность встречается в геноме от нескольких сотен до сотен тысяч раз. Именно при изучении кинетики реассоциации впервые были обнаружены диспергированные повторяющиеся последовательности. Кинетика реассоциации позволяла также охарактеризовать взаимное расположение уникальных и повторяющихся последовательностей, периодичность повторов.

Схема опыта представлена на рис. 2. Чтобы получить препараты молекул ДНК разной длины, суммарную ДНК фрагментируют случайным образом и затем разделяют центрифугированием в градиенте плотности хлорида цезия CsCl. Фрагменты денатурируют и отжигают при фиксированных значениях C_0t (C_0 — это концентрация ДНК в момент времени t), после чего подвергают фракционированию на колонках с гидроксилалатитом. На кривых реассоциации геномной ДНК повторяющимся последовательностям соответствуют участки с низким и средним значением C_0t , а уникальным — участок с высоким C_0t .

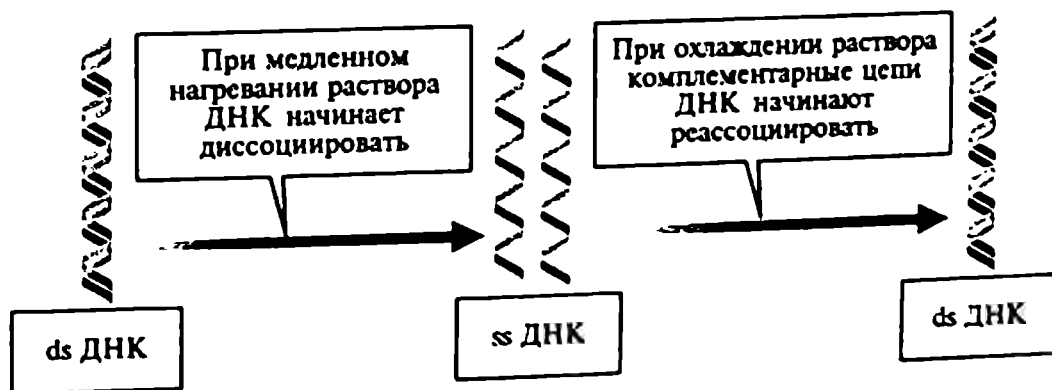


Рис. 1. Схема денатурации ДНК (ss ДНК — одноцепочечные структуры) с последующим восстановлением двухцепочечной структуры (ds ДНК)

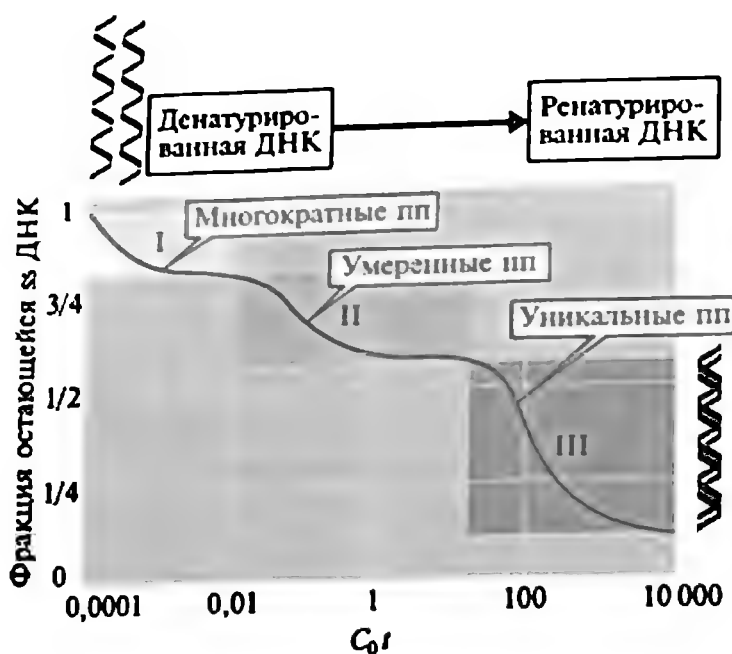


Рис. 2. Типичная C_0t кривая эукариот.

Кривая состоит из нескольких шагов. Первый шаг на кривой (I) — ДНК, ренатурирующая при очень низких значениях C_0t , что соответствует фракции повторяющейся ДНК, представленной многочисленными копиями. Второй шаг (II) — ДНК, ренатурирующая при средних значениях C_0t , что соответствует умеренным повторам ДНК. Последний шаг (III) — медленно реассоциирующая ДНК, представленная уникальными последовательностями

Таким образом, согласно данным кинетического анализа, под структурой и организацией генома понимают совокупность фракций нуклеотидных последовательностей ДНК в геноме данного организма, различающихся по частоте повторяемости, взаимному расположению и относительному содержанию.

Метод плавления двойной спирали ДНК с последующим ее восстановлением из комплементарных одноцепочечных полинуклеотидных цепей нашел одно из своих наиболее интересных применений в геносистематике высших организмов. Основная идея использования этого метода сводится к следующему: чем больше одинаковых генов у двух организмов, тем ближе их родство. Поэтому если провести отжиг смеси ДНК двух организмов и установить количество образовавшихся гибридных двойных спиралей, можно судить о степени родства между данными организмами.

Эукариотические геномы содержат гораздо больше ДНК, чем это представляется необходимым. Ядерный геном у грибов по своему размеру занимает промежуточное положение между геномом бактерий и высших эукариот. В среднем размер генома у грибов на два порядка меньше, чем у высших растений. Число хромосом у разных грибов составляет 2—28, большинство видов имеет 10—12 хромосом. Гораздо более значительные колебания отмечены в

количестве ДНК на гаплоидный геном — от 0,015 нг у дрожжей *Saccharomyces* до 8,2 нг у зигомицета *Entomophaga*, т. е. более чем в 500 раз (для сравнения — разница в содержании ДНК среди высших растений составляет менее 100 раз). Общее содержание ДНК на гаплоидное ядро в царстве грибов может значительно варьировать как в пределах одной таксономической группы, так и между различными классами. Наименьший размер имеет геном аскомицета *Aeshbya gossypii* — $9,7 \cdot 10^6$ н.п. (нуклеотидных пар); геном аскомицетных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* оценен в $1,35 \cdot 10^7$ н.п. Геном *Aeshbya* является самым маленьким среди всех исследованных эукариот (меньшие размеры ДНК имеют только нуклеоморфы некоторых водорослей, но они встречаются не у свободноживущих организмов, а у эндосимбиотических структур). Значительные колебания в содержании ДНК отмечены и среди базидиомицетов: размер генома вешенки *Pleurotus ostreatus* составляет 0,023 пг, что соответствует $2,1 \cdot 10^7$ н.п., а у плютея оленего *Pluteus cervinus* он почти на порядок больше и оценивается в 0,1 пг, или $9 \cdot 10^7$ н.п. Для сравнения: у человека геном включает $2,9 \cdot 10^9$ н.п.

Мелкие хромосомы грибов (по сравнению с высшими эукариотами) позволяют биохимическими методами разделять тотальную ДНК ядра многих видов грибов на отдельные молекулы, составляющие хромосомы. Для этих целей используют ортогональный, или пульсирующий, электрофорез. На электрофореграммах, полученных с помощью этого метода, можно не только разделить хромосомы, но и определить их молекулярную массу, а также выделить ДНК отдельных хромосом для дальнейших исследований. Метод импульсного электрофореза революционизировал цитогенетику грибов, облегчил кариотипирование (определение числа хромосом и их морфологии) и картирование (определение порядка расположения генов внутри хромосомы и расстояний между генами) многих видов, а также позволил установить специфические структуры генома грибов. В частности, с помощью этого метода была обнаружена гетероплоидность генома у многих видов, т. е. варьирование числа хромосом у отдельных штаммов внутри вида. Наряду с более крупными хромосомами, обязательными для нормального существования клетки, в ядрах многих грибов присутствуют более мелкие В-хромосомы, число которых неопределенно и которые у отдельных штаммов вообще могут отсутствовать (подробнее см. с. 50).

Большой размер эукариотических геномов обусловлен наличием в них множества повторяющихся последовательностей ДНК (ПП), на долю которых, по приблизительным оценкам, приходится от 10 %, а в некоторых случаях и до 50 % генома. У истинных грибов наблюдаем низкий процент ПП, которые у бактерий почти отсутствуют, а у высших эукариот составляют значительную часть генома. Исключение составляют оомицеты (псевдогри-

Таблица 1. Семейства повторяющихся последовательностей в геномах грибов (%)

Виды грибов	УП	ПП	ОП
Аскомицеты			
<i>Neurospora crassa</i>	90	8	2
<i>Aspergillus nidulans</i>	97	3	—
Базидиомицеты			
<i>Schizophyllum commune</i>	90,6	7	2,4
<i>Pleurotus ostreatus</i>	69,5	25,5	5
Зигомицеты			
<i>Phycomyces blakesleeanus</i>	55	35	10

Примечание. Следует заметить, что эти данные получены на основе кинетики реассоциации и ДНК-ДНК-гибридизации — методов, допускающих погрешности до 15—20 %. Современные методы молекулярной биологии позволяют более точно охарактеризовать структуру генома.

бы), в геноме которых повторы составляют 18—65 %, и зигомицет *Phycomyces blakesleeanus*, на долю ПП у которого приходится до 45 % всей ДНК.

Определяя кинетику реассоциации ДНК, исследователи смогли выделить три основные фракции нуклеотидных последовательностей — уникальные последовательности (УП), повторяющиеся (ПП) и обращенные повторы (ОП) (табл. 1).

Уникальные последовательности — наиболее сложно организованный и основной по массе компонент генома эукариот. Истинно уникальные последовательности — это те последовательности, которые встречаются один раз на гаплоидный геном и в основном представлены структурными генами. Семейства ПП в значительной степени многообразны и полифункциональны. Среди них имеются как многократно повторяющиеся (до 1 млн копий на гаплоидный геном), так и умеренно повторяющиеся (от 10 до 10⁴ копий на геном). Повторы могут быть длинными: от 200—400 до 2000 н.п. и более. Есть еще группа так называемых обращенных, или инвертированных, повторов (ОП): это взаимно комплементарные последовательности ДНК, локализованные на одной нити и мгновенно ренатурирующие с образованием «шпилек».

В ходе дальнейшего изложения мы не раз будем сталкиваться с различной природой и функциональной значимостью ПП. Здесь же следует отметить, что уже начальные исследования показали: большинство из них являются структурными генами рРНК и тРНК. рРНК-кодирующие последовательности (гены рРНК) — это собранные в кластеры последовательности 18S; 5,8S, 28S рРНК с транскрибируемыми спейсерами между ними. Такой рибосомный блок у грибов повторяется от десятков до нескольких сотен раз на геном. Гены рРНК расположены в виде длинных повторов типа «голова к хвосту». Рибосомные блоки из трех рРНК-генов раз-

граничиваются и фланкируются внешними (ETS — external transcribing spacer) и внутренними транскрибируемыми спейсерами (ITS — internal transcribing spacer). Ранее транскрибируемые спейсеры считали нетранскрибируемыми (NTS), но позже стало известно, что с этих участков осуществляется транскрипция, и продукты транскрипции участвуют в регуляции экспрессии генов рДНК. Поэтому сейчас можно встретить более подходящее для этих последовательностей название — межгенные спейсеры (IGS — internal gene spacer). Например, единица транскрипции рДНК-генов у *S. cerevisiae* — одна из самых маленьких среди эукариот — составляет 6—7 тыс. нуклеотидных пар (н.п.) (рис. 3). Большинство повторяющихся единиц рДНК (если не все) расположены в одном тандемном кластере на XII хромосоме.

В царстве грибов обнаружены различия в распределении по геному генов низкомолекулярных 5S рРНК. Гены 5S рРНК транскрибируются с участием РНК полимеразы III (pol III), транскрипцию же всего кластера генов рРНК катализирует РНК-полимераза I (pol I). Следует заметить, что РНК-полимераза III транскрибирует гены, кодирующие тРНК, 5S рРНК и другие низкомолекулярные РНК. Чаше всего у грибов встречается структура кластера рРНК с локализацией генов 5S РНК в пределах рДНК-го кластера, как у *Schizophyllum commune*, *Coprinus cinereus*. У дрожжей гены 5S РНК чередуются с другими генами рРНК в пределах одной повторяющейся единицы, но транскрипция их осуществляется независимо от остальных генов; длинный полицистронный транскрипт генов 18S, 5,8S и 28S рРНК образуется при участии РНК-полимеразы I (см. рис. 3). Исключение обнаружено у *Neurospora crassa*: гены 5S рРНК диспергированы по всему геному и пространственно отделены от генов, кодирующих высокомолекулярные 28S и 18S рРНК.

Уникальные последовательности — это наиболее сложно организованный и основной по массе компонент генома эукариот. В основном они представлены структурными генами.

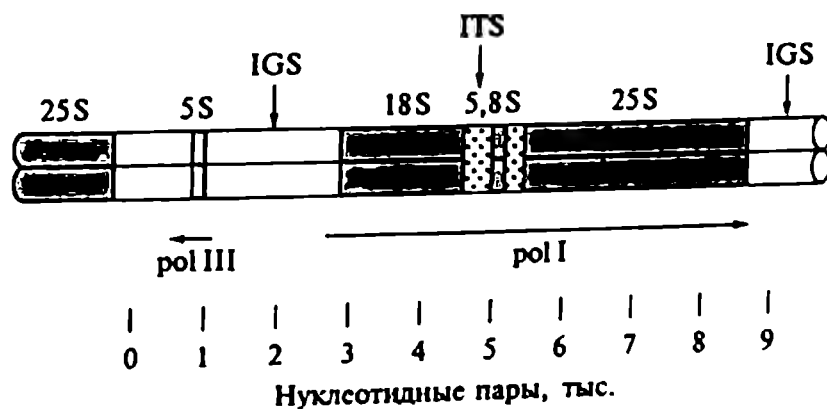


Рис. 3. Дрожжевой рДНК-цистрон

Структура гена

Исследования середины 1970-х годов, прежде всего связанные с внедрением новых методов секвенирования ДНК, коренным образом изменили представление о структурной организации гена эукариот. Существует два метода секвенирования ДНК: метод А. Максама и В. Джилберта, основанный на химическом гидролизе полинуклеотидной цепочки ДНК, и метод Сэнгера, основанный на использовании ДНК-полимеразы, который широко применяется по сей день.

Уже первые результаты секвенирования последовательностей ДНК показали, что почти все гены эукариот (за некоторым исключением, например рибосомные гены дрожжей) имеют *мозаичную структуру* и состоят из экзонов и интронов. Термин «*интрон*» был предложен одним из авторов методов секвенирования В. Джилбертом в 1978 г. Интроны — это некодирующие последовательности ДНК, разделяющие кодирующие последовательности структурных генов эукариот на отдельные участки — экзоны. Экзоны — участки генома, с которых считываются последовательности зрелых мРНК и которые непосредственно кодируют полипептидные последовательности. Экзонные последовательности прерываются или чередуются с некодирующими интронами. Как правило, на долю интронов приходится больше ДНК, чем на долю экзонов. Наличие интронных структур в генах является основным и принципиальным отличием структурной организации геномов эукариот от прокариот. Именно наличие интронов в структурных генах определяет весь последующий процесс транскрипции и основное отличие организации генов эукариот от прокариот. Все интроны транскрибируются в составе РНК-предшественника и впоследствии удаляются в процессе разрыва-воссоединения, который называется *сплайсингом*. Схематически этот процесс представлен на рис. 4.

В ядре с ДНК-матрицы транскрибируются предшественники мРНК (пре-мРНК), после чего там же в ядре происходит их созревание, или процессинг. В ходе процессинга пре-мРНК превращаются в конечные зрелые мРНК-продукты, которые функционируют в цитоплазме как матрицы для последующих процессов трансляции.

Итак, в ходе процессинга происходит вырезание интронных последовательностей и сплайсинг экзонных последовательностей. Интроны могут находиться как между отдельными кодонами, так и внутри кодонов (т.е. прерывать триплет нуклеотидов), поэтому их вырезание должно происходить очень аккуратно, чтобы не были нарушены ни сама последовательность триплетов, ни рамка считывания. Очевидно, что сплайсинг должен осуществляться чрезвычайно точно, поскольку удаление даже одного нуклеотида

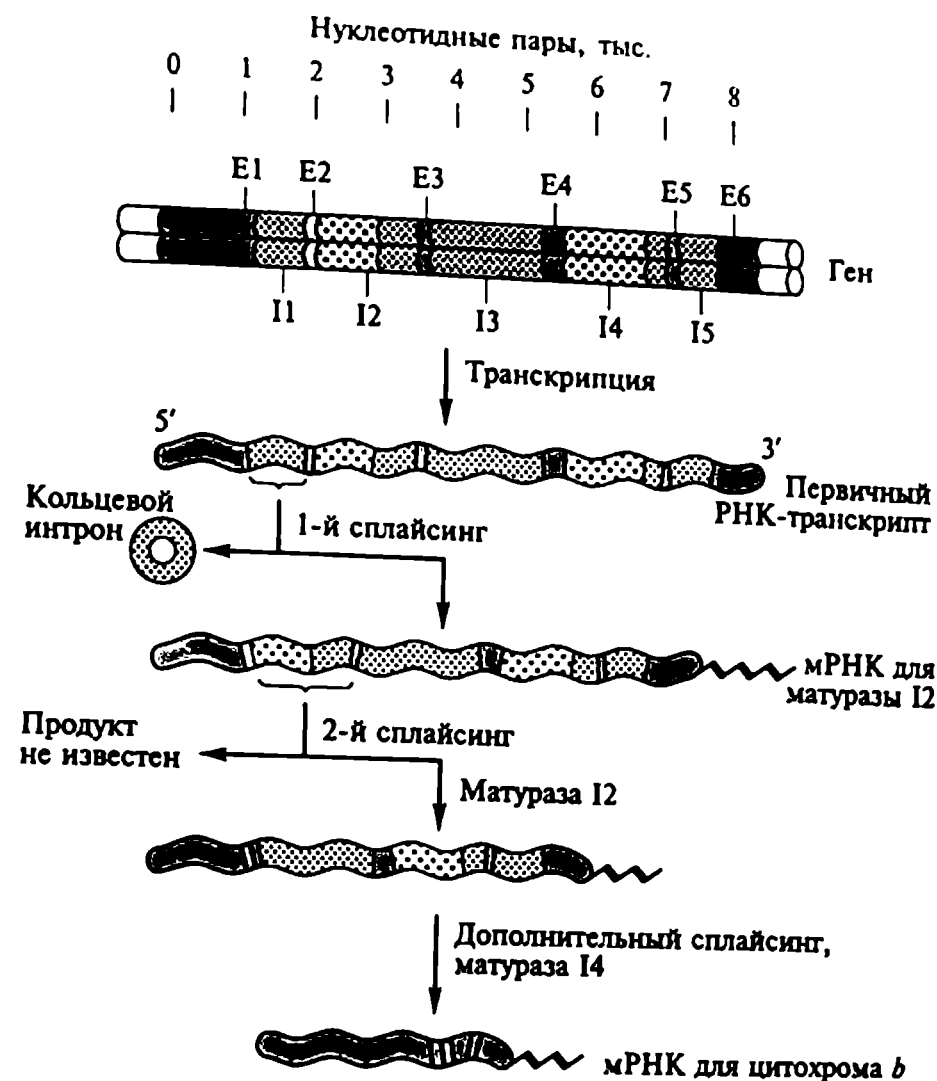


Рис. 4. Транскрипция эукариотических генов на примере гена цитохрома *b* дрожжей (интроны выделены точками)

приведет к смещению рамки считывания образующейся матрицы (мРНК) и, следовательно, к нарушению белковой последовательности.

Что же направляет точный механизм сплайсинга? Основа этого механизма находится в самих нуклеотидных последовательностях, кодирующих интроны, т. е. сами интронные последовательности обеспечивают точный механизм сплайсинга.

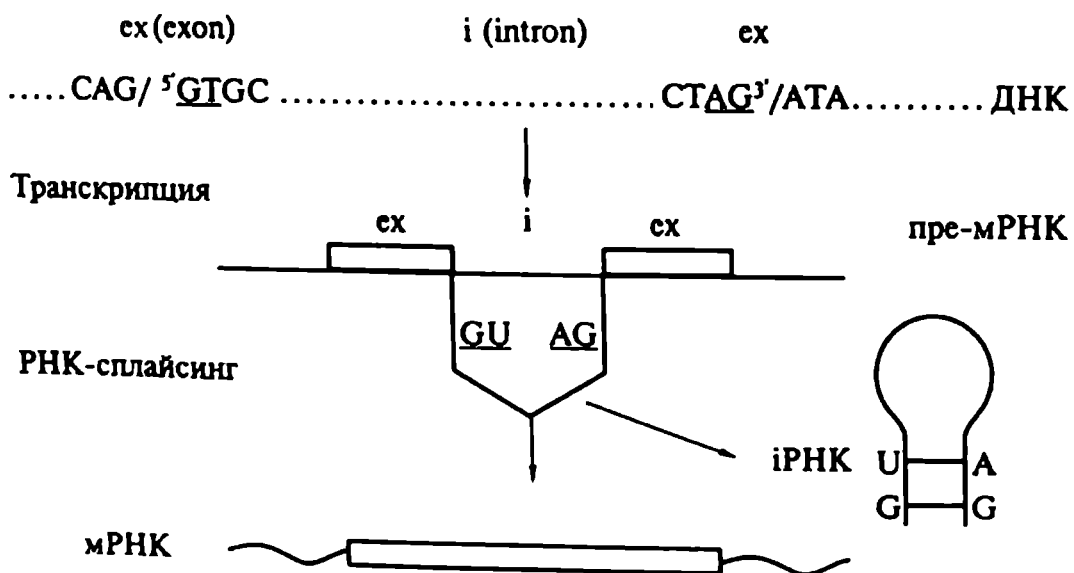
Интроны

У структурных ядерных генов, кодирующих белки, нуклеотидные последовательности на границах интрон/экзон весьма консервативны: любой интрон структурного ядерного гена начинается с динуклеотида GT и заканчивается AG. Внутри интронов консервативны только участки, прилегающие к кодирующим эк-

зонам и участвующие в сплайсинге. Эти участки называются *сайтами сплайсинга*. Замена остатка G или T в пограничной области между интронной и экзонной последовательностями обычно блокирует сплайсинг.

Сплайсинг инициируется специфическим взаимодействием между нуклеотидами экзонной и интронной последовательностей, фланкирующих сплайсинговый сайт. Короткие инвертированные повторы в интронных последовательностях необходимы для осуществления сплайсинга на уровне молекул пре-мРНК. Границы интронов/экзонов обычно соответствуют аминокислотным остаткам, расположенным на поверхности белков.

Механизм сплайсинга следующий: происходит инициируемый интроном (концевым гуанозином G) разрыв по 5'-концу сплайсингового сайта, затем следует РНК-катализируемая реакция трансэтерификации, в ходе которой 3'ОН-группа расположенного слева (upstream) экзона атакует фосфат 3'-конца сплайсингового сайта. Затем происходит лигирование экзонных последовательностей и вырезание интрона. Внутренняя направляющая последовательность (IGS — internal guide sequence) возле 5'-конца интрона, как полагают, спаривает 5'- и 3'-концы экзона посредством соединения интронных и экзонных элементов P1 и P10 (так называемых канонических последовательностей). Таким образом, наличие неких канонических последовательностей в сайтах сплайсинга обеспечивает точное вырезание интрона. Схема сплайсинга с участием классического ядерного интрона приведена ниже:



Понятно, что если произойдет мутация в пограничной зоне (на границе экзон/интрон), будет нарушен механизм сплайсинга, следовательно, нарушится последовательность мРНК, что по-

Таблиц: 2. Канонические последовательности яблии сайтов сплайсинга разного типа

Тип интрона	5'-сайт сплайсинга	3'-сайт сплайсинга
Ядерная пре-мРНК (дрожжи)	<u> GUAUGU</u>	<u>Y_nAG N</u>
Группа I (ядерные рРНК митохондриальные мРНК и рРНК)	<u> U </u>	<u> G </u>
Группа II (митохондриальные мРНК)	<u> GUGCG</u>	<u>Y_nΔU </u>
тРНК	<u>N N</u>	<u>N N</u>
мРНК хлоропластов (<i>Euglena</i>)	<u>GUG^c_UG</u>	<u>Y_nΔ^u_d</u>

Примечание. Представлены последовательности РНК. Y — пиримидин; n — число пиримидинов. Инвариантные основания подчеркнуты; вертикальными линиями показаны сайты сплайсинга; N — любое азотистое основание (*T. Cech // Cell. 44, 1986. P. 207.*)

влечет нарушение белковой последовательности при трансляции. При нарушении аминокислотной последовательности белка нарушается и его функция. Итак, мРНК, или информационная РНК, с которой осуществляется синтез белка, — это «переработанный» в ходе процессинга первичный РНК-транскрипт с ДНК, поступающий из ядра в цитоплазму.

Резонно задать вопрос: зачем гену нужны интроны? На первый взгляд может показаться, что это некоторая избыточная ДНК. Однако это далеко не так. В ряде случаев интроны выступают фактически экзонами других генов, т.е. вырезаемые iРНК в свою очередь являются мРНК других белков, участвующих в сплайсинге. Тем не менее, несмотря на функциональную значимость интронных последовательностей, исследователями установлен факт более быстрой изменчивости (дивергенции) интронных структур по сравнению с экзонными. Показано, что интроны способны быстро изменяться за счет двух основных механизмов: во-первых, быстро перестраиваться за счет вставок, делеций и дупликаций коротких участков ДНК; во-вторых, медленно изменяться за счет точковых мутаций — нуклеотидных замен. Многие мутации в интронной области являются «молчащими», пока они не затрагивают функционально значимые участки ДНК.

Некоторые интроны кодируют так называемые *белки созревания, или матуразы* (от англ. *maturation* — созреть), которые обеспечивают созревание мРНК и принимают непосредственное участие в сплайсинге. Об этом подробно будет изложено далее.

Грибы имеют наиболее короткие интроны. Средняя длина грибного интрона составляет 85 н. п., с размахом значений длины от 36 до 250 н. п. К настоящему времени описано 5 групп интронов. В основе классификации этих элементов лежат особенности их

строения и соответствующие механизмы сплайсинга. Иными словами, деление по группам основано на различных молекулярных механизмах вырезания интронов из пре-мРНК (табл. 2).

Классические ядерные интроны

Классические ядерные интроны, или интроны генов ядерных мРНК, начинаются динуклеотидом GT и заканчиваются AG. В ходе сплайсинга они вырезаются и накапливаются в форме маленьких ядерных рибонуклеопротеидных частиц (snRNPs — small nuclear ribonucleoproteids). Именно эта группа интронов была впервые обнаружена в ядерных генах эукариот.

Интроны группы I. Встречаются предпочтительно в геномах органелл (митохондриях, хлоропластах водорослей), бактериофагов; некоторые из них обнаружены в ядерных геномах, например в генах рРНК низших эукариот (слизевика *Physarum polycephalum*). Большинство митохондриальных интронов грибов принадлежит группе I. Длина их превышает 1000 н. п. Для интронов этой группы известны две функции: а) способность автономно перемещаться в гомологичные сайты ДНК по принципу мобильных элементов за счет того, что они сами кодируют белки «транспозазы», или сайт-специфические эндонуклеазы; б) способность к автономному сплайсингу за счет того, что они сами кодируют «белки созревания».

Интроны группы II. Распространены менее широко, чем интроны группы I. Встречаются только в геномах органелл — митохондрий, хлоропластов; у грибов незначительное количество описано в мт-геномах (митохондриальных геномах). Интроны группы II не содержат канонических последовательностей, характерных для интронов группы I, но они тоже имеют специфическую вторичную структуру, образуемую благодаря внутримолекулярному спариванию оснований. Канонические последовательности — это некие «постоянные» характерные нуклеотидные последовательности в пределах какой-либо структуры (в данном случае в пределах интронной последовательности), которые необходимы для успешного прохождения сплайсинга и формирования вторичной структуры молекулы ДНК. Многие интроны группы II, как показано, кодируют обратные транскриптазы — ферменты, позволяющие синтезировать ДНК-копию на РНК-матрице. Механизм транскрипции будет разобран позднее на примере «синдрома старения» у *Podospora anserina*, связанного с вырезанием последовательности α -*sen* из митохондриального гена цитохромоксидазы *cox I*.

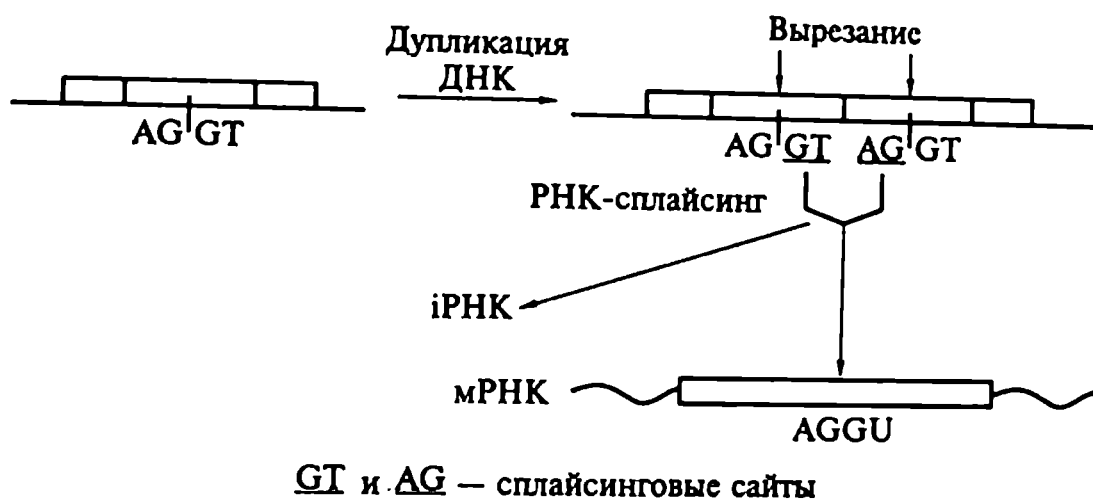
Интроны группы III. Это короткие, АТ-обогащенные нуклеотидные последовательности. У грибов они не обнаружены, описаны у водорослей, например у *Euglena*.

Интроны генов транспортных РНК (тРНК). Имеются у всех эукариот; никаких особых функций для них не описано. Размеры их невелики — от 14 до 60 н.п., но они локализуются всегда в одном и том же месте: через один нуклеотид от 3'-конца антикодона. У генов, кодирующих разные тРНК, внутренние и фланговые участки интронов заметно различаются.

Механизмы интеграции интронов и их происхождение

Интроны из различных групп отличаются не только механизмами их вырезания из пре-мРНК, но и предполагаемыми механизмами интеграции (инсерции) в новые участки ДНК. Рассматривая различные механизмы интеграции интронов, можно предположить возможные пути их происхождения в ходе эволюции.

Ядерные интроны. Для них предложен механизм происхождения путем дупликаций экзонных последовательностей:



Интроны группы I. Как уже было сказано, многие из них кодируют белки матуразы, участвующие в сплайсинге и способные обеспечить сплайсинг интронных структур как *in vivo*, так и *in vitro* (показано экспериментально). Интроны катализируют свой собственный сплайсинг, который может протекать *in vitro* в отсутствие каких бы то ни было других белков. Информация, необходимая для сплайсинга, содержится во множестве относительно коротких внутренних (канонических) последовательностей в пределах интрона, которые обеспечивают укладку молекулы с образованием характерной пространственной структуры. Сплайсинг инициируется свободным гуанозином или любым из его 5'-фосфорилированных производных. Конечными продуктами сплайсинга являются мРНК и линейная РНК, размер которых несколько

меньше, чем размер интрона. Полагают, что в результате внутри-молекулярного спаривания некоторых канонических последовательностей интрон приобретает конфигурацию, благоприятную для автокаталитического сплайсинга.

Для некоторых интронов группы I была также экспериментально продемонстрирована функция мобильных генетических элементов, т.е. способность к перемещению в новые участки ДНК, причем инсерция интронов (их интеграция) происходила по типу сайт-специфической рекомбинации. Сайт-специфические эндонуклеазы разрезают ДНК в месте интеграции интрона, и происходит его дальнейшее встраивание путем генной конверсии, т.е. имеет место сайт-специфическая рекомбинация. Участки-мишени для эндонуклеаз, кодируемых интронами группы I, как правило, характеризуются протяженными последовательностями узнавания. Эндонуклеаза делает двухцепочечный разрыв в молекуле ДНК и таким образом инициирует мобильность интрона. Двухцепочечные разрывы «залечиваются» потом по интронсодержащей донорной аллели, служащей матрицей.

Впервые эта способность была продемонстрирована в 1980-е годы в работах Дюжона, проведенных на дрожжах *S. cerevisiae* (B. Dujon, 1980). При изучении мт-гена, кодирующего большую субъединицу рРНК (*LrRNA*), был выделен локус ω^+ длиной 1,1 тыс. н.п. При скрещивании ω^+ -штаммов с ω^- -штаммами происходила сайт-специфическая рекомбинация, в результате чего все потомки от скрещивания несли ω^+ -последовательность, т.е. происходила передача интронной последовательности почти всему потомству:

ω^+ — омега⁺-штаммы с интронной последовательностью по гену *LrRNA*
x
 ω^- — омега⁻-штаммы без интрона в гене
↓
100 % штаммов с ω^+ -последовательностью

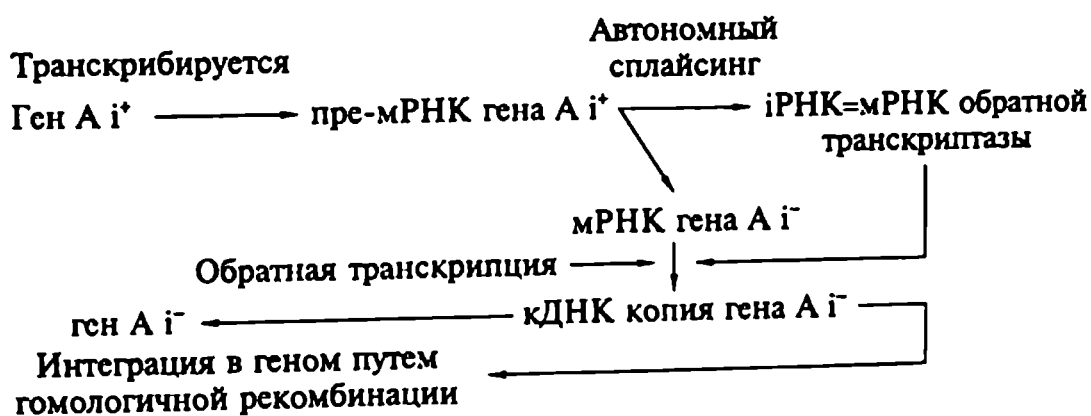
Механизм конверсии клеток в потомстве для ω^+ следующий: интронная последовательность кодирует белок *fit1*, или транспозазу, которая есть не что иное, как сайт-специфическая эндонуклеаза, разрезающая ДНК в месте интеграции интрона и способствующая его инсерции путем генной конверсии (по типу сайт-специфической рекомбинации).

Подобные интроны с сайт-специфической эндонуклеазной активностью, позволяющей им перемещаться в гомологичные сайты ДНК, обнаружены в генах митохондрий грибов, в ядерных генах рРНК возбудителя головни *Ustilago maydis*, лишайникообразующего гриба *Cladonia chlorophea*, слизевика *Physarum polycephalum*, в ядерных рРНК генах зеленых водорослей, а также у бактериофагов.

Ввиду широкого распространения интронов группы I можно предположить, что подобный инсерционный механизм размножения/распространения интронов действовал при горизонтальной передаче интронов другим генам разных видов и даже при обмене между прокариотами и эукариотами.

Многие интроны группы I имеют одновременно две рамки считывания и кодируют одновременно оба белка — как сайт-специфическую эндонуклеазу, так и матуразу, т.е. характеризуются «сопряженными функциями» (например, интрон цитохромоксидазного гена *cytb* аскомицета *Podospora anserina*, 3-й интрон гена НАДН-дегидрогеназы *NDI i3 P. anserina*).

Интроны группы II. Иной совершенно противоположный механизм перемещения интронов — путем обратной транскрипции — обнаружен для интронов группы II. Схематично процесс обратной транскрипции представлен далее на рис. 7. При участии обратной транскриптазы может происходить вырезание интронной последовательности, в результате чего ген теряет эту последовательность, и таким образом происходит замена интрон-содержащего гена на ДНК-последовательность без него:



Разберем этот механизм на примере последовательности *α-sen* в мт-геноме *Podospora anserina* (рис. 5). Работы по секвенированию митохондриального генома гриба в лаборатории А.Кьюмингса в 1990-е годы показали, что последовательность *α-sen* есть не что иное, как первый интрон митохондриального цитохромоксидазного гена *cox1 i1*, (или *COI*), вызывающий «синдром старения» (senescence) у гриба. «Старение» вегетативно растущих фоток проявлялось в остановке роста мицелия и прекращении формирования воздушных гиф с последующим лизисом клеток. Было отмечено, что признак передавался через анастомозы гиф другим клеткам, что указывало на цитоплазматическое, связанное с мт-геномом наследование. В молодых растущих клетках последовательность *α-sen* является интегрированной в мт-геном, а ее способность вызывать «старение» культур связано с ее последующим накоплением в цитоплазме в виде ковалентно замкнутых моле-

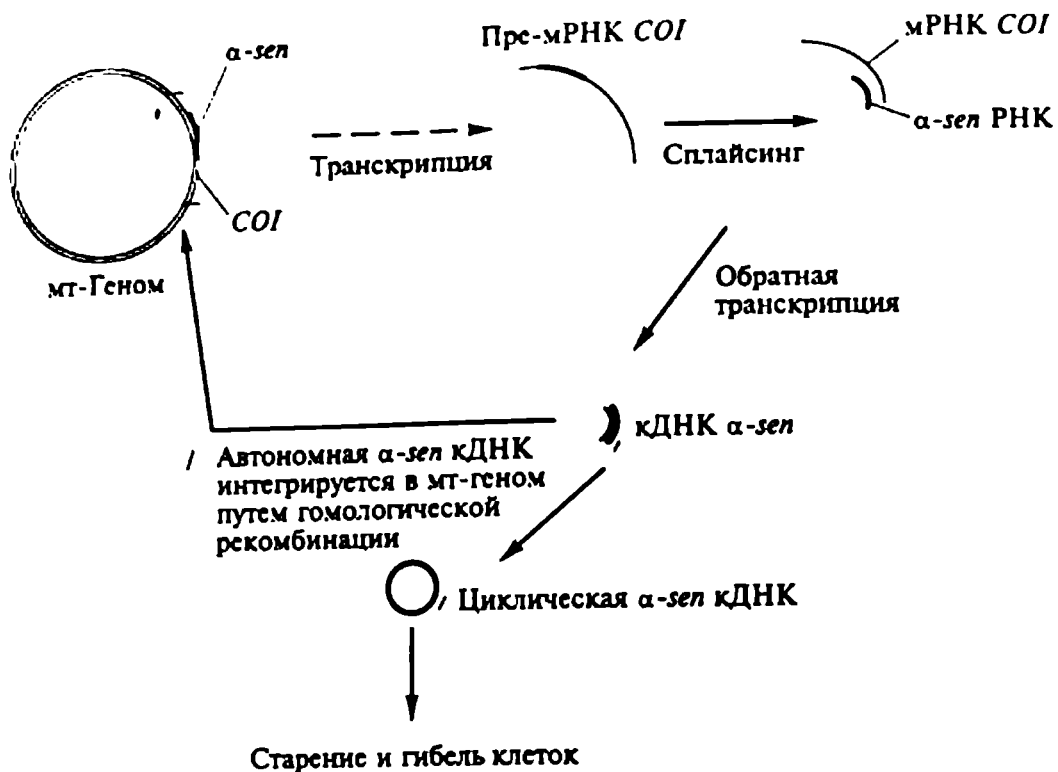


Рис. 5. Схема вырезания и накопления последовательности α -sen в «стареющих» культурах *P. anserina*.

Последовательность кодирует полипептид, гомологичный обратной транскриптазе. Эта последовательность способна автономно реплицироваться с помощью механизма обратной транскрипции с последующей циклизацией скопированной последовательности в кольцо

кул. В «стареющих» культурах эта интронная последовательность накапливается в цитоплазме в виде циклических молекул α -sen. Затем циклические молекулы способны интегрироваться в гомологичный участок соответствующего интрон-содержащего гена, что приводит к тандемным дупликациям данной интронной последовательности. Таким образом, дублицированные интронные последовательности в мт-геноме являются сайтами гомологичной рекомбинации, за счет чего и происходит накопление дефектных мтДНК при старении культур. Такие мт-геномы накапливают огромное количество делеций, что неизбежно ведет к нарушению транскрипции функционально значимых генов дыхательной цепи (блокирование респираторной цепи), и, как следствие, кончики гиф не могут расти из-за нехватки энергетических ресурсов. Было показано, что мобильность этой интронной последовательности связана с тем, что сама последовательность кодирует белок обратную транскриптазу.

Интересным является факт обнаружения у митохондриального интрона *a1 S.cerevisiae* сопряженных функций, сочетающих од-

новременно матуразную (обеспечивающую автономный сплайсинг) и обратнотранскриптазную активности.

Еще одна важная биологическая роль интронов связана с тем, что эти последовательности ДНК оказывают значительное влияние на рекомбинации между гомологичными генами: некодирующие интронные последовательности увеличивают длину генов, повышая тем самым шансы на кроссинговер, и позволяют с большей вероятностью обмениваться неповрежденными функциональными единицами генов. Поэтому считается, что «мозаичная» структура генов эукариот облегчает и ускоряет эволюцию наряду с мобильными генетическими элементами.

Реорганизация генома. Структурные перестройки и модификации геномов

Грибы — это чрезвычайно пластичная группа организмов. Исследователи постоянно сталкиваются с различными формами проявления изменчивости у грибов, нестабильности их геномов. Можно выделить следующие основные формы проявления генетической нестабильности:

- нестабильные, часто изменяющиеся (мутирующие) гены;
- перемещающиеся генетические элементы;
- особые генетические элементы, благодаря транспозициям которых изменяется пол клеток, например, как у почкующихся (*S. cerevisiae*) и делящихся (*Schizosaccharomyces pombe*) дрожжей;
- факторы, стимулирующие митотическую рекомбинацию и даже утрату целых хромосом.

Все эти проявления так или иначе связаны с мобильными генетическими элементами (МЭ). Примером нестабильных генетических аллелей как одной из форм проявления генетической нестабильности могут служить *nic-2*-мутация *Coprinus radiatus* (дефект по синтезу никотиновой кислоты), ревертирующая в мейозе с частотой 20 %, или нестабильные мутации *ad-3*-локуса *Neurospora crassa*. Однако впоследствии при утрате мобильного элемента локус становится стабильным.

История изучения МЭ. Впервые о мобильных генетических элементах, или, как их еще называли, «прыгающих» генах, заговорили в начале 1950-х годов, когда Барбара МакКлинток высказала смелое предположение о том, что геном кукурузы содержит мобильные ДНК-последовательности, способные перемещаться из одной хромосомы в другую. Их она назвала «контролирующими элементами», способными вызывать нестабильные мутации и перестройки хромосом. Были описаны *Ac*- и *Ds*-элементы (*activator*, *dissociation*), супрессоры-мутаторы (*Spm*). Вначале подобное предположение было встречено в научном мире скептически. Впо-

следствии Барбара МакКлинтон получила в 1983 г. Нобелевскую премию за свое открытие. Позже появилось много спекуляций на предмет присутствия мобильных элементов в геномах эукариот, особенно когда исследователи столкнулись с различными проявлениями нестабильности и вариабельности признаков. Детальное изучение транспозонов стало возможным после того, как их научились клонировать. Первыми клонированными мобильными элементами были МДГ-элементы *Drosophila melanogaster* (*mdg* — *mobile dispersed genetic elements*).

Мобильные генетические элементы, или *транспозоны*, — это последовательности ДНК, способные автономно реплицироваться, а также вырезаться и интегрироваться в новые локусы генома. За последние пятнадцать лет транспозоны обнаружены у большого числа исследованных видов грибов из разных таксономических групп, и этот список постоянно пополняется. Вероятно, можно утверждать, что подобные мобильные элементы являются неизменным атрибутом любого грибного генома.

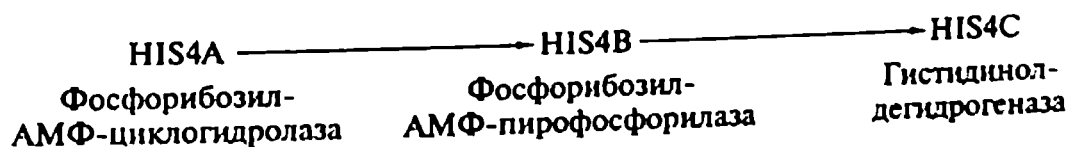
Можно выделить три основных периода в изучении мобильных генетических элементов. Первый период связан с работами Б. МакКлинтон и с представлениями о транспозирующихся элементах как о «паразитах» в геноме. Второй период характеризуется накоплением данных о распространенности мобильных элементов практически у всех групп организмов, как прокариотических, так и эукариотических. Причем мобильные элементы эукариот сходны со своими прокариотическими «родственниками» в том отношении, что их транспозиции обеспечиваются генами, содержащимися в пределах этих элементов, а также специфическими концевыми последовательностями. Период накопления данных о грибных транспозонах пришелся на конец 1970-х — начало 1990-х годов, когда МЭ были описаны у многих грибов, особенно фитопатогенных. Современный этап связан с детальным молекулярно-генетическим изучением транспозонов, что стало возможным после того, как их научились клонировать. Сейчас исследователи пытаются ответить на многие вопросы, в частности: а) каким образом мобильные элементы влияют на те или иные процессы в геномах; б) какие функции выполняли и выполняют транспозоны в эволюции. Общепризнанным является мнение о транспозонах как о движущем факторе эволюции: считается, что именно они обеспечивают пластичность геномов эукариот в процессе быстрого видообразования. Транспозоны составляют значительную долю всего генома в различных царствах эукариот. Например, в геноме человека, по данным секвенирования, до 50 % всего генома приходится на различные семейства транспозонов.

Транспозоны, обнаруженные в грибных геномах, отражают весь спектр существующего разнообразия этих элементов среди эука-

риот. Как и у других эукариот, транспозоны грибов принадлежат двум классам, принципиально различающимся между собой структурой и механизмами их передачи (транспозиции). Передача транспозонов класса I осуществляется через РНК-посредника с участием ферментов интеграции — *обратных транскриптаз*: ДНК → РНК → ДНК. Транспозоны класса II характеризуются непосредственной транспозицией ДНК → ДНК, что обеспечивается ферментами *транспозазами*, кодируемыми самими транспозонами. Концевые (терминальные) повторы, фланкирующие транспозонную последовательность (длинные прямые, LTRs, — у транспозонов класса I, и короткие инвертированные, ITRs, — у транспозонов класса II), функционально значимы и принимают непосредственное участие в передаче транспозонов в новые сайты, являясь свособразными *мишенями интеграции*. Наличие у вновь перемещенных копий транспозонов дупликаций ДНК в участках интеграции (TSDs — target site duplications), расположенных в концевых повторах, свидетельствует в пользу выше упомянутых механизмов интеграции в отличие от обычной рекомбинации.

Обнаружить и продемонстрировать активные транспозиции мобильных элементов можно экспериментально несколькими способами: а) с помощью так называемых «ловушек» транспозонов (transposon trapping) — эта методика основана на том, что известный охарактеризованный ген прерывается (gene disruption) вставкой активного транспозона (например, *Folyt1 Fusarium oxysporum* вызывал нестабильные мутации при его вырезании из *nit1*-гена); б) путем спонтанных инсерций в ген, например *tnir*-ген *Tolypocladium inflatum*, прежде не охарактеризованный и вовлеченный в азотный метаболизм; в) по мутантным фенотипам, ревертирующим к дикому типу с высокой частотой, при этом вырезание транспозона может сопровождаться восстановлением функции гена; г) путем клонирования и анализа повторяющихся последовательностей ДНК — так были обнаружены *MGR* и *grasshopper* транспозирующиеся элементы *Magnaporthe grisea*, *Foret* элемент *Fusarium oxysporum*, *CFT-1*-транспозон *Cladosporium fulvum*, *restless* транспозон *Tolypocladium inflatum*, о которых будет рассказано далее.

Один из первых детальных генетических анализов нестабильных аллелей был сделан на локусе *HIS4* гена *S. cerevisiae* в конце 70-х гг. Локус *HIS4*, расположенный на III хромосоме, состоит из трех групп комплементации — генов А, В и С; этим генам соответствуют активности, катализирующие последовательные этапы биосинтеза гистидина:



Транскрипция и трансляция генов происходит в направлении, указанном стрелками, от *HIS4 A* → *B* → *C*. Экспериментально было показано, что *HIS4C* последовательность перемещалась с III на IV хромосому, причем в местах ее интеграции происходили летальные рецессивные мутации (*HIS4C*⁻). Перемещенный *HIS4C*-локус был нестабилен и с частотой до 1 % вырезался, после чего всегда происходило восстановление активности гена, в которой он был встроен. Дальнейшие исследования пролили свет на это явление: *HIS4C*-локус содержал *Ty1* (*transposable yeast*) элемент с прямыми повторами на концах в 334—338 н.п. (детальная схема молекулярной организации *Ty1* будет представлена ниже в этой главе). Однако ревертанты *HIS4*⁺ фенотипически отличались от диких штаммов *HIS4*⁺ и были холодочувствительными. Как оказалось, связано это было с тем, что *Ty1* вырезался не целиком: в локусе *HIS4* оставалась одиночная σ -последовательность (концевой повтор), или так называемый «инсерционный след», причем эта вставка приблизительно в 300 н.п. почти не мешала функционированию локуса. Вероятно, такое вырезание происходило путем гомологичной реципрокной рекомбинации по прямым повторам σ -сегментов, фланкирующих *Ty1*-элемент (рис. 6).

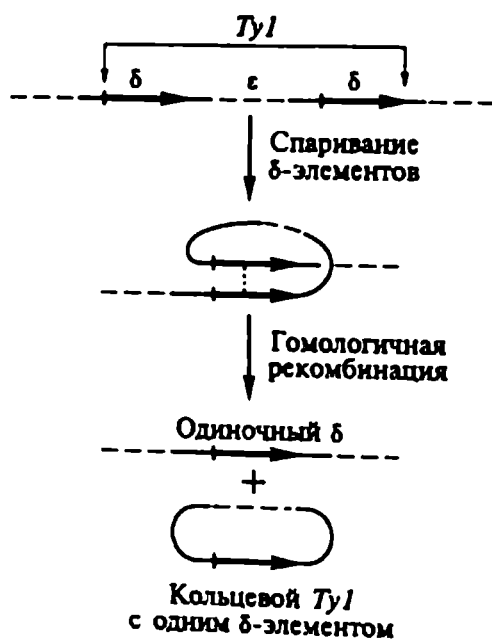


Рис. 6. Вырезание *Ty1* путем обычной гомологичной рекомбинации. Кольцевая *Ty1* ДНК либо теряется, либо путем гомологичной рекомбинации может интегрироваться в хромосомные локусы, несущие δ -подобные элементы

Детальное изучение *Ty1*-элементов дрожжей началось с работ Дж. Камерона с соавт. в 1979 г. Было показано, что в геноме дрожжей имеется до 35 мобильных копий *Ty1*, что составляет приблизительно 2 % всего генома. Интеграция *Ty1*-элементов в геном дрожжей может быть выгодной, однако показано, что накопление большого числа *Ty1* копий уменьшает жизнеспособность клеток. В природе должен поддерживаться баланс между уровнем транспозиций и жизнеспособностью клеток. *Ty1*-элементы, как показано, способны селективно интегрироваться в определенные области генома, причем их интеграция, помимо характерного для этого класса транспозонов обратотранскриптазного механизма, может происходить путем обычной гомологичной рекомбинации по хромосомным локусам, содер-

жащим σ -элементы, т.е. по концевым повторам (см. рис. 6). Это было показано экспериментально и подтверждается наличием разбросанных по всему геному дрожжей одиночных копий σ -элементов. Помимо полноразмерных *Ty*-элементов у *S. cerevisiae* имеется примерно 100 одиночных σ -элементов.

Транспозоны класса I. Транспозиции (перемещения) МЭ этого класса в новые участки осуществляются путем обратной транскрипции с РНК-посредника: ДНК $\rightarrow$ РНК $\rightarrow$ ДНК (с участием обратной транскриптазы), т.е. происходит транспозиция, включающая РНК-интермедиат. Транспозоны этого класса состоят из центрального сегмента длиной несколько тысяч пар нуклеотидов и фланкирующих его длинных прямых повторов на концах размером от сотен до тысяч пар оснований (LTRs — long terminal repeats) (рис. 7) или заканчиваются с одного конца полиаденилированным хвостом (poly(A) tract, или poly(A) -хвостом), свойственным *LINE*- и *SINE*-элементам. Транспозоны I класса называют также *LTR-ретротранспозонами* за их сходство с ретровирусами животных. Несколько пар оснований в начале и в конце каждого LTR также представляют собой инвертированные друг относительно друга повторы. Встраивание ретротранспозона в новый локус сопровождается дупликацией сайта-мишени, причем размер дублицированного участка (но не его последовательность) для данного элемента всегда одинаков. Эти ретротранспозоны, как

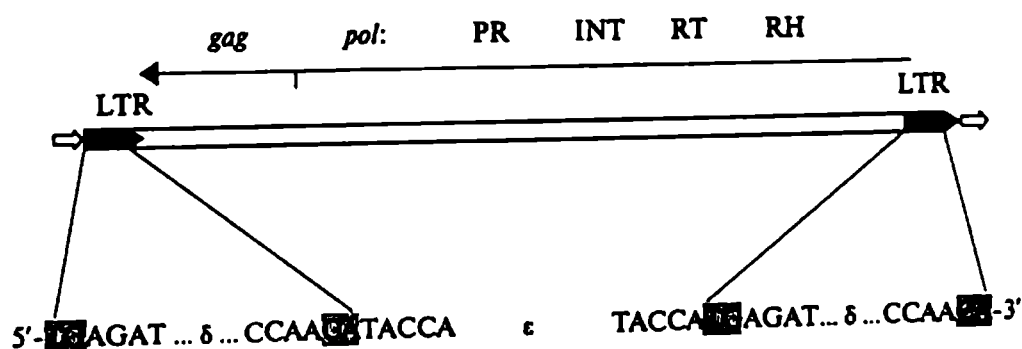


Рис. 7. Структурная организация дрожжевого ретротранспозона *Ty1*.

Черные прямоугольники со стрелками изображают длинные прямые концевые повторы (δ -последовательности); примыкающие к ним незаштрихованные стрелки — прямые повторы ДНК-мишени. Направление стрелок указывает ориентацию соответствующих повторов. Инвертированные последовательности в 2 н.п. на каждом из концов δ -элементов отмечены заштрихованной областью. Стрелка над мобильным элементом показывает направление транскрипции генов. Масштаб не соблюден. Размер — около 5,9 тыс. н.п., прямые концевые повторы — по 330 н.п., прямые повторы ДНК-мишени — по 5 н.п. С центральной части элемента, включая значительную часть его концевых повторов, считается единый транскрипт. Ген *gag* кодирует структурный РНК-связывающий белок. Ген *pol* кодирует общий белок, который содержит в качестве доменов протеазу (PR), интегразу (INT), обратную транскриптазу (RT) и РНКазу H (RH).

и все МЭ, образуют в геномах мультисемейства. Транспозоны этого класса, как правило, активно транскрибируются и транслируются; несут открытые рамки считывания (ORF — open reading frame) обратных транскриптаз. На самом деле, как, например, у дрожжей, рамок считывания в пределах транспозона может быть более одной, и все они кодируют ферменты, способствующие интеграции интронов в новые хромосомные локусы (рис. 7).

В процессе интеграции участвуют специальные ферменты, кодируемые ретровирусным геном *pol*. Ген *pol* кодирует общий мультифункциональный белок, который содержит в качестве доменов протеазу (PR), интегразу (INT), обратную транскриптазу (RT) и РНКазу H (RH). Сперва считывается общий транскрипт, а потом протеаза разрезает общий длинный полипептид на отдельные ферменты (происходит так называемый посттрансляционный протеолиз). Таким образом, обратная транскриптаза обеспечивает синтез комплементарной ДНК копии *Tu*, протеаза отвечает за посттрансляционный процессинг, интеграна необходима для транспозиции. Несмотря на обилие *Tu*-транскриптов, их трансляция в дрожжевых клетках протекает с очень низкой эффективностью.

Механизм интеграции транспозонов I класса также впервые был продемонстрирован на примере *Tu*-элементов *S.cerevisiae*. Перенос *Tu*-элемента происходит с помощью обратной транскрипции РНК-копии *Tu* по существу таким же способом, каким синтезируется ретровирусная ДНК на ретровирусной геномной РНК (рис. 8). Подтверждение

этому было получено в прямых опытах. С геномной ДНК элемента транскрибируется РНК-копия, но уже с короткими

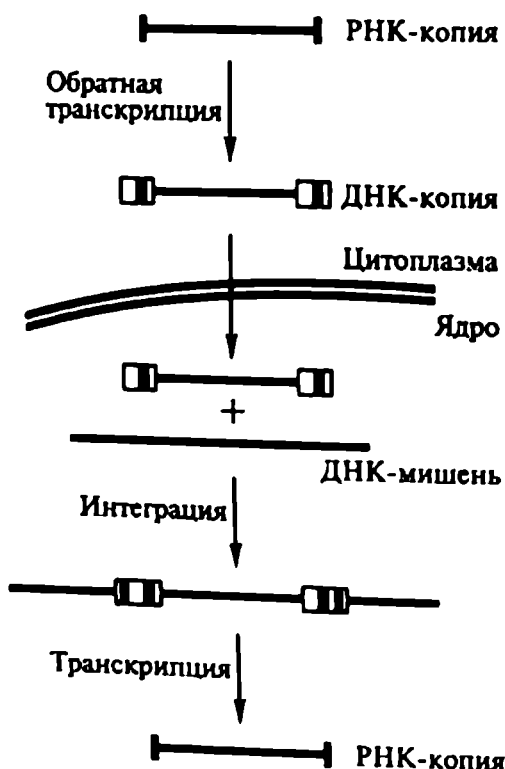


Рис. 8. Упрощенная схема транспозиции ретротранспозонов I класса.

Короткие прямые концевые повторы РНК-копии представлены в виде прямоугольников. Двухспочечная ДНК-копия ретротранспозона — с длинными прямыми концевыми повторами (светлые прямоугольники). Прямые повторы ДНК-мишени из 5 н.п. представлены крайними прямоугольниками, примыкающими к ретротранспозону в месте интеграции. Масштаб не соблюден. Остальные пояснения см. в тексте

концевыми прямыми повторами; с нее путем обратной транскрипции синтезируется ДНК-копия с длинными повторами, которая и встраивается в новый сайт с помощью интегразы. Рекомбинация у ретроэлементов без концевых повторов менее изучена, но

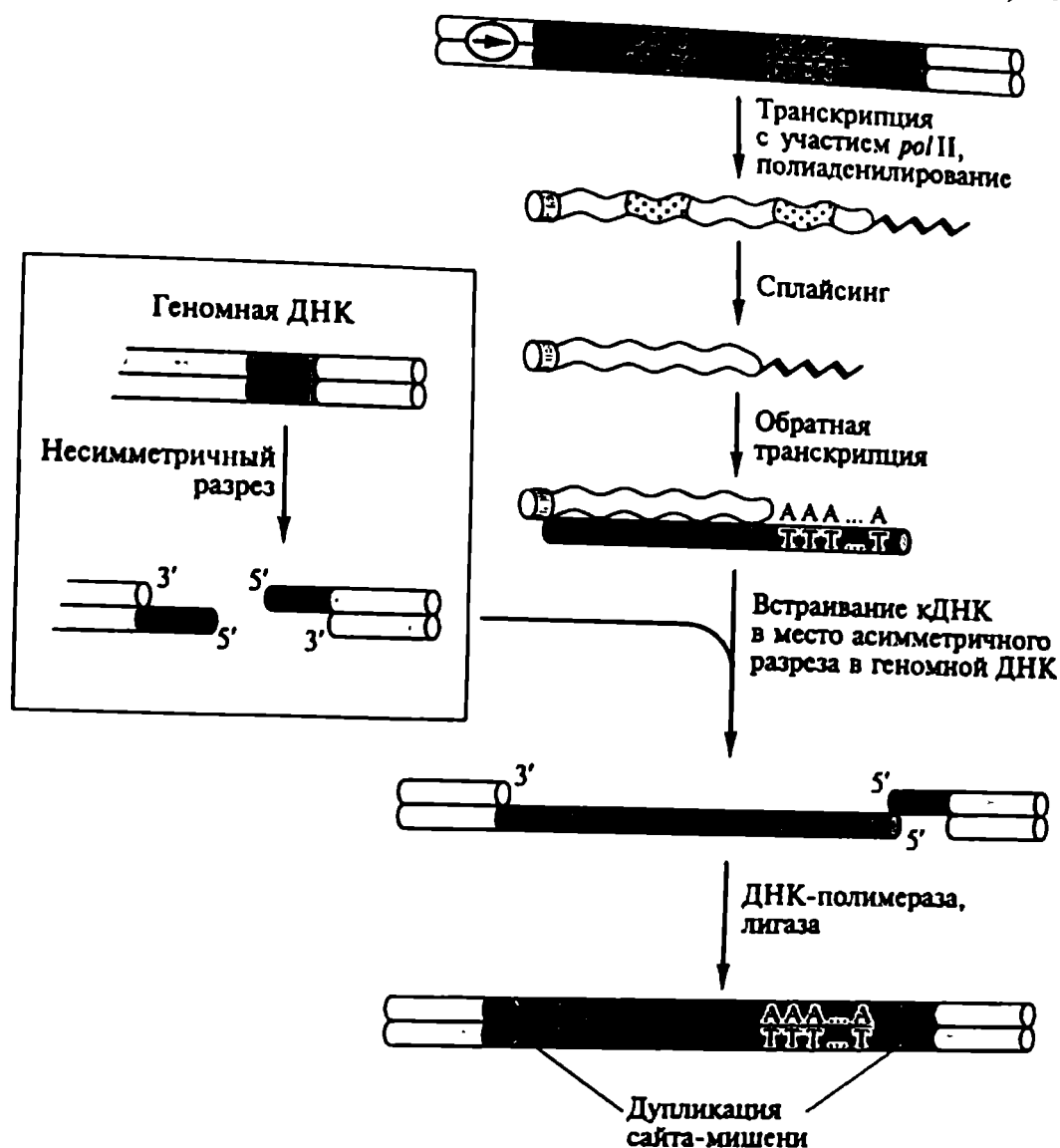


Рис. 9. Дупликация сайтов-мишеней в результате транспозиции ретропозона I класса при участии РНК-посредника (цит. по: М. Сингер и П. Берг. Гены и геномы. — 1998. — Т. 2)

В результате транскрипции и процессинга, включающего сплайсинг интронов, образуется функциональная мРНК, на которой с помощью обратной транскриптазы синтезируется цепь кДНК; РНК-матрица затем расщепляется, например, РНКазой H. Одноцепочечная ДНК пришивается через 3'-гидроксильный конец к 5'-концу геномной ДНК в месте несимметричного разреза, и с помощью ДНК-полимеразы синтезируется вторая цепь. Альтернативный способ состоит в синтезе двухцепочечной кДНК еще до встраивания или в присоединении цепи РНК в месте разрыва ДНК и синтезе обеих цепей кДНК *in situ*. В результате этих реакций образуются TSD-сайты с дублированными повторами

она также осуществляется через РНК-интермедиат. Встраивание Ty -элементов всегда сопровождается дупликациями сайтов-мишени размером 5 н. п. (рис. 9).

Подобные элементы встречаются также в геноме человека, высших растений, насекомых, и все они похожи на ретровирусы. Поэтому транспозоны этого класса еще называют ретропозонами, или ретротранспозонами.

Транспозоны класса II. Для них характерна непосредственная транспозиция: ДНК $\rightarrow$ ДНК, т. е. посредством ДНК-интермедиата. Эти транспозоны обычно имеют длину несколько тысяч нуклеотидных пар и на концах несут короткие инвертированные повторы (*ITRs* — *inverted terminal repeats*). При их встраивании также происходят дупликации сайта-мишени (TSDs), но длина дуплицированного участка для разных элементов варьирует. На 3'-конце одной из цепей имеется АТ-богатая последовательность, а центральная часть кодирует белки *транспозазы* (аналогично интронам группы I с сайт-специфической эндонуклеазной активностью). Транспозаза разрезает ДНК по специфическому сайту, а затем происходит интеграция транспозона путем генной конверсии (по типу сайт-специфической рекомбинации) (рис. 10). Транс-

позиция начинается с образования одноцепочечных разрывов в донорной и реципиентной ДНК. У донора такие разрывы происходят с обоих 3'-концов элемента, у реципиента — в сайте-мишени с образованием 5'-выступов. Далее разрезанные концы МЭ соединяются с концами ре-

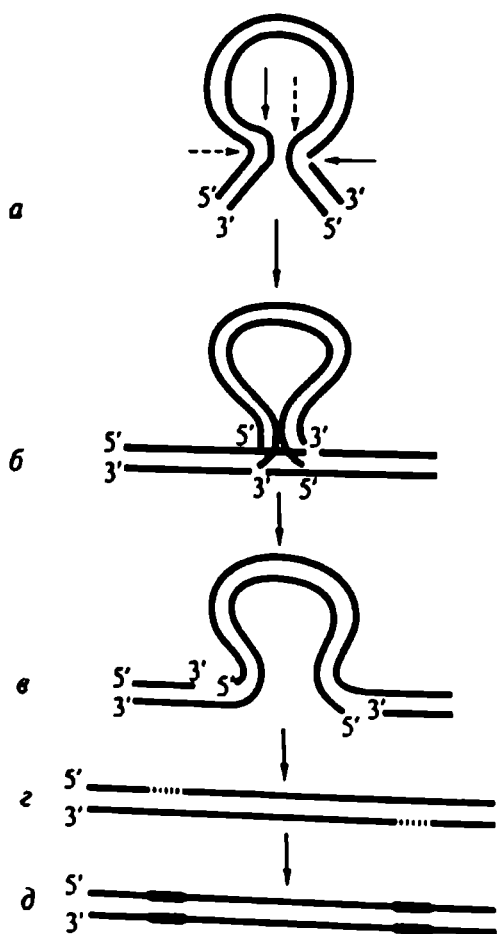


Рис. 10. Общая схема рекомбинационных реакций (а—д) при транспозициях мобильных элементов II класса.

Линии соответствуют цепям ДНК. Сплошные стрелки (а) указывают сайты обязательных разрывов цепей ДНК на концах мобильного элемента, пунктирные стрелки — сайты необязательных разрывов. Штрих-линия (г) изображает репаративную репликацию в брешах ДНК-мишени, что приводит к образованию прямых повторов из нуклеотидов ДНК-мишени по бокам встроившегося элемента. Эти повторы выделены утолщенными линиями (д). Остальные пояснения см. в тексте

ципиента и образуется общий промежуточный продукт. Если в цепях, противоположных по отношению к разрезанным первоначально, никаких дополнительных разрывов не происходит, то имеет место простое встраивание. В результате заполнения брешки и лигирования происходит дупликация сайта-мишени. Это перепликативная транспозиция, которую и катализирует *транспозаза*: фактически она ускоряет разрезание на концах МЭ, а затем воссоединение разорванных концов.

Для транспозонов класса II бактерий и животных *in vivo* и *in vitro* показано, что транспозазы разрезают элемент точно по 3'-концу элемента, что обеспечивает дальнейший переброс цепи (strand transfer reaction). Разрыв по 5'-концу элемента происходит не точно по концевому нуклеотиду, а может варьировать среди различных семейств, оставляя брешки (в 2, 3 и даже 17 нуклеотидов). Далее следует реакция репарации образовавшейся брешки по 5'-концу. В этом как раз и заключается дополнительный мутагенный эффект, наблюдаемый в результате вырезания транспозона, так как репарация брешей редко восстанавливает оригинальную последовательность.

Дупликация сайтов-мишеней. Интеграция большинства МЭ, как уже было сказано выше, приводит к дупликации короткого участка ДНК в месте встраивания — в сайте-мишени интеграции (target site), поэтому каждый элемент оказывается фланкированным дуплицированными сайтами-мишенями (TSD — target site duplication) консервативной длины, а иногда консервативными бывают и сами последовательности этих сайтов. Почти обязательная дупликация сайтов-мишеней указывает на то, что, несмотря на различия в механизмах, большинство вставок сопровождается образованием в потенциальных сайтах-мишенях смещенных одноцепочечных разрывов, как это показано на рис. 9. Размер дуплицированных последовательностей у разных МЭ различается. Для транспозонов класса I характерны дупликации сайтов-мишеней определенного размера (4—8 н. п.). В то же время при встраивании транспозонов класса II происходят дупликации участков разного размера. Это, вероятно, обусловлено специфичностью ферментов, катализирующих образование смещенных одноцепочечных разрывов в сайтах-мишенях интеграции. Неизменность размеров дуплицированных участков, характерных для транспозонов класса I, по-видимому, связана с тем, что ДНК разрезается специфическими эндонуклеазами, кодируемыми каждым из этих элементов.

В настоящее время описано еще одно семейство МЭ — так называемые *MITEs* (miniature inverted transposable elements); причем они найдены как у животных, так и у растений и грибов. Это небольшие транспозоны, диспергированные по всему геному и обнаруживаемые как между генами, так и в пределах интронных последовательностей.

Встречающиеся в геномах грибов неактивные и утратившие способность к перемещению МЭ обычно происходят от автономных элементов, способных обеспечивать свои собственные транспозиции. Инактивация транспозонов может происходить в результате накопления точечных мутаций и внутренних делеций в пределах рамок считывания. В этом случае транспозиции неактивных элементов обеспечиваются *транс*-активизацией генов, которые находятся в других мобильных элементах (см. ниже).

Модификации и перестройки в геномах, происходящие под действием МЭ. Как правило, каждый тип мобильных элементов встречается в геноме многократно, т.е. элементы образуют семейства диспергированных повторяющихся последовательностей. Такие семейства способствуют дальнейшим геномным перестройкам, создавая сайты для неаллельных гомологичных рекомбинаций, что приводит к делециям, дупликациям, инверсиям и транслокациям. Эта способность мобильных элементов облегчать перестройки неоднократно была подтверждена на примере *Ту*-элементов дрожжей. Если такие перестройки происходят в единичных соматических клетках, то вероятность их влияния на функционирование всего организма мала. Но в клетках полового цикла они могут вызывать серьезные мутационные изменения и хромосомные aberrации. Если такие перестройки фиксируются в популяции в результате естественного отбора или генетического дрейфа, то это будет иметь заметные эволюционные последствия.

Транспозиции МЭ могут вызывать следующие эффекты:

- хромосомные перестройки (делеции, дупликации, инверсии, транслокации) благодаря гомологичной рекомбинации между членами из одного семейства транспозонов; при этом новые копии транспозонов в геноме обеспечивают новые сайты гомологий для неравных кроссинговеров;

- перемещения протяженных сегментов ДНК путем транспозиций или незаконных рекомбинаций;

- изменение процесса транскрипции генов; при вырезании транспозонов происходят либо изменения генопродуктов, либо мутации смещения рамок считывания;

- изменение экспрессии генов: интеграция транспозонов в структурные или промоторные области чаще блокирует экспрессию генов, но также может изменять механизм регуляции гена;

- амплификация ДНК-последовательностей с образованием псевдогенов (псевдогены — это нефункциональные утратившие промоторные области генов, многие из которых не содержат и интронных последовательностей).

При детальном изучении *Ту*-элементов дрожжей было показано, что к геномным перестройкам может приводить также неравный гомологичный кроссинговер между диспергированными повторами в сестринских хроматидах или в гомологичных хромо-

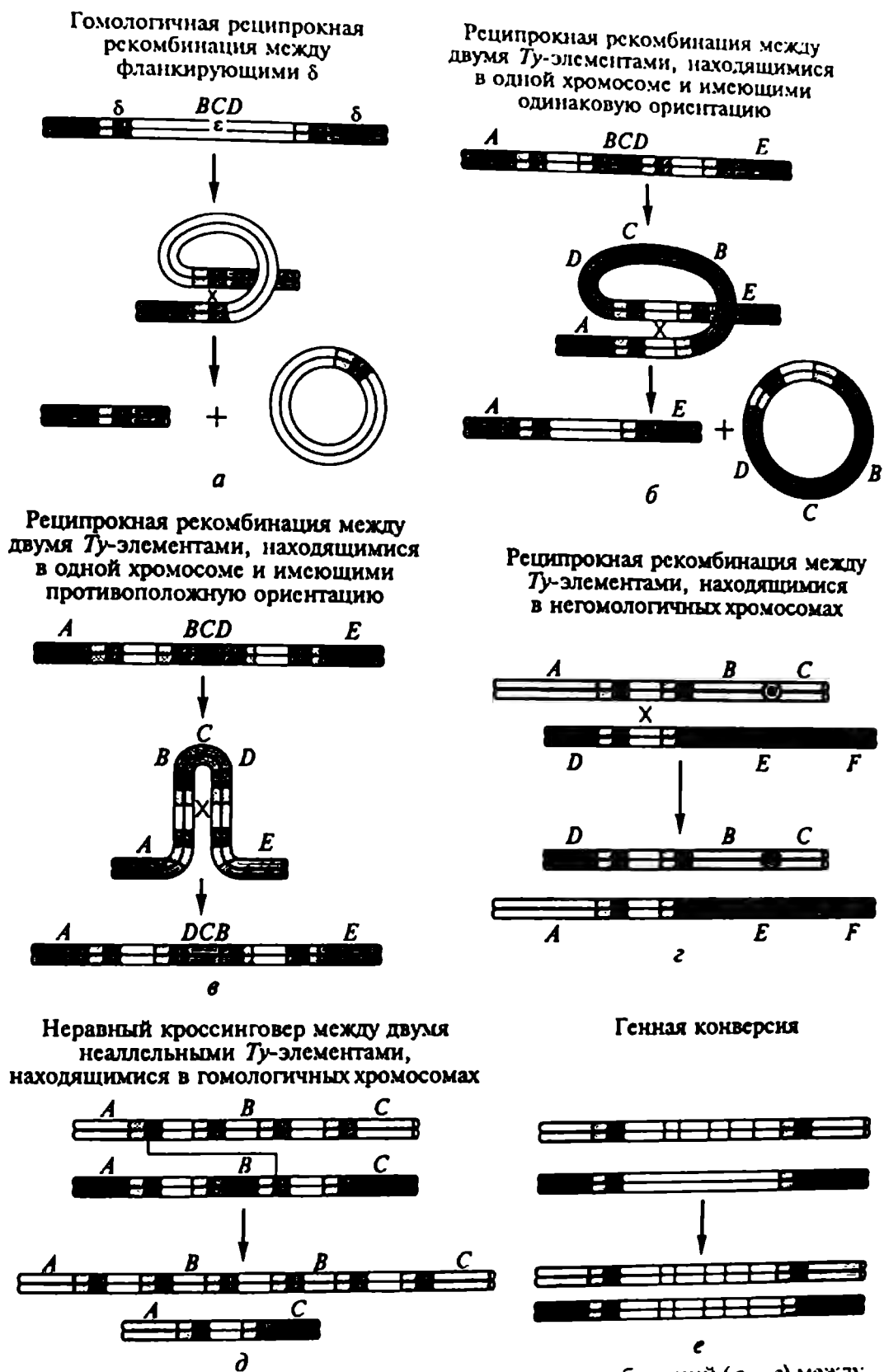


Рис. 11. Хромосомные перестройки в результате рекомбинаций (а — е) между Ту-элементами и σ -последовательностями (М. Сингер, П. Берг. Гены и геномы, 1998. Т. 2)

сомах, что также будет вызывать протяженные мутации, связанные с хромосомными перестройками (рис. 11). Иными словами, протяженные мутации происходят путем *неравной рекомбинации* между локусами, содержащими гомологичные последовательности транспозонов. Очевидно, что в ходе неравной рекомбинации могут изменяться наследование группы генов и доза генов. В случае же реципрокных рекомбинаций между противоположно ориентированными *Ту*-элементами, находящимися на одной и той же хромосоме, возможны *инверсии*; если же *Ту*-элементы расположены на разных хромосомах, то возникают *транслокации*.

Мобильные элементы грибов (транспозоны) могут обладать промоторными функциями, т.е. способны влиять на характер регуляции клеточных генов; иногда при их интеграции активность генов повышается в десятки раз. В отличие от транспозонов прокариот, переносящих целые гены, *Ту*-транспозоны грибов способны переносить лишь регуляторные участки, тем самым влияя на функции генов. Нередко встраивание МЭ в регуляторный или кодирующий участок приводит к подавлению экспрессии соответствующего гена, но, как правило, последствия оказываются более сложными (рис. 12). В некоторых случаях промотор, расположенный внутри самого элемента, может индуцировать экспрессию соседнего ранее молчавшего гена. Например, встраива-

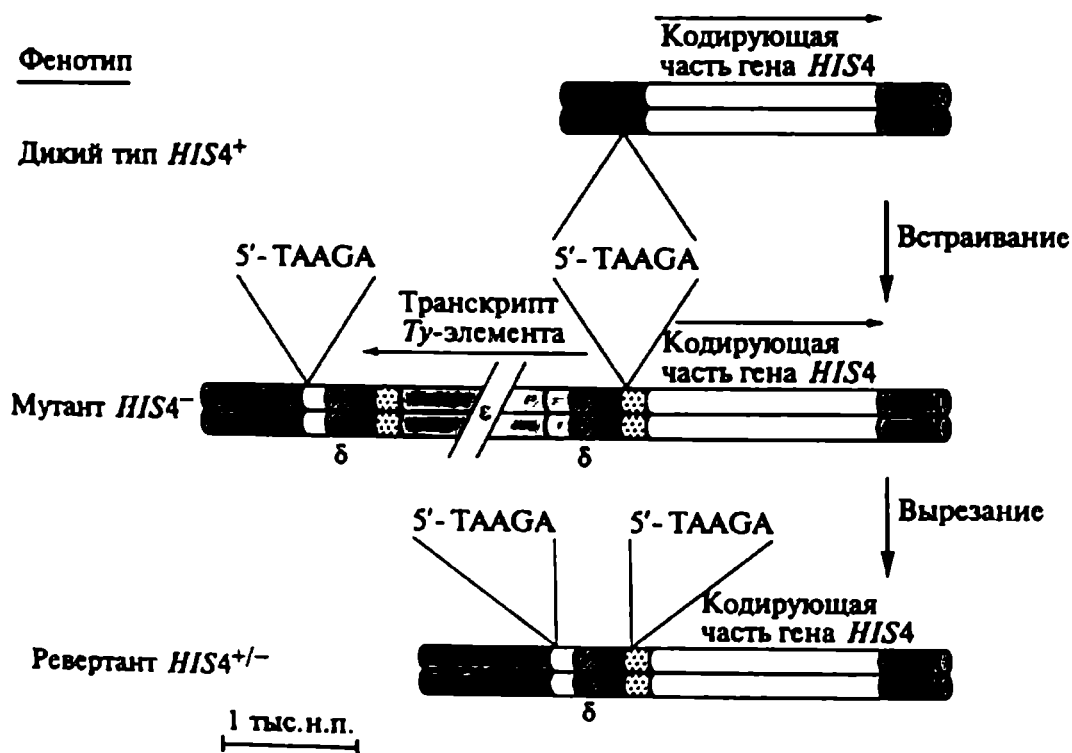


Рис. 12. Встраивание *Ту*-элемента в промоторную область гена *HIS4*. Это приводит к появлению мутанта *HIS4*⁻. В результате вырезания *Ту*-элемента с сохранением части одного из δ -сегментов происходит частичная реверсия к *HIS4*⁺

ние *Tu*-элемента в 5'-регуляторный участок соответствующей транскрипционной единицы может приводить к разным фенотипическим эффектам. В ряде случаев транскрипция генов, соседствующих со вставкой, прекращается, при этом *Tu*-элемент может находиться в любой ориентации. В других случаях, наоборот, возможно 50-кратное увеличение уровня синтеза мРНК и соответственно продукта гена, примыкающего к вставке *Tu*. Интересно, что у «сверхпродуцентов» *Tu*-элемент всегда оказывается встроенным в промоторную область, причем транскрибируется в направлении, противоположном направлению транскрипции соседнего гена. Примером могут служить так называемые *ROAM*-мутации (*regulated overproducing alleles responding to mating type*) дрожжей *S. cerevisiae*. Встраивание *Tu1* в 5'-фланкирующую область гена *сус 7*, кодирующего 2-изоцитохром *C*, приводило к увеличению экспрессии этого гена в 20 раз, причем сверхпродукция наблюдалась лишь в гаплоидных клетках α или α . Таким образом, транскрипция *Tu1* была чувствительна к статусу клетки по типу спаривания: у диплоидов (MATa/α) она была в 5—20 раз меньше, чем у гаплоидных клеток. Экспрессия *ROAM*-аллелей снижалась при наличии *Tu1*, указывая на то, что их транскрипция подвержена регулированию состоянием клетки, определяемым типом спаривания.

Теперь рассмотрим детально некоторые транспозоны, обнаруженные в грибных геномах.

Транспозоны класса I

Одним из первых транспозонов, обнаруженных у мицелиальных грибов, был *Tad1*-ретропозон *Neurospora crassa*. Он был описан в 1989 г. у штамма *Adiopodoume* Дж. Кинси и П. Хелбером (J. Kensey, Helber). Авторы, работая с геном, кодирующим глютаматдегидрогеназу *am*, изолировали два мутанта со вставкой в 7 тыс. н. п., которую назвали *Tad1* (*transposable Adiopodoume*). *Tad1*-элемент представлял собой умеренно повторяющуюся последовательность без длинных терминальных повторов на концах (non-LTR ретропозон). В экспериментах *Tad1* вызывал протяженные мутации типа дупликаций, а его полное секвенирование показало наличие гомологий с консервативными последовательностями обратной транскриптазы. Подобные последовательности обнаружены также среди ретропозонов млекопитающих, названных *LINE*-элементами. *Tad1* был способен автономно передаваться из ядра в ядро в гетерокарионах. В цитоплазме обнаруживали также полиаденилированные РНК-транскрипты с *Tad1*, свидетельствующие о происходящих процессах транскрипции. Это позволило предположить механизм передачи данных транспозонов из ядра в ядро при посредничестве РНК (аналогично non-LTR-retroposons).

Транспозон *CFT-1*, обнаруженный у патогена томатов, *Cladosporium fulvum*, длиной 6968 н. п., также кодирует обратную транскриптазу, имеет длинные концевые повторы длиной 427 н. п. и дупликации в 5 н. п. в сайтах интеграции. Этот транспозон очень близок *Gypsy*-классу LTR-ретропозонов с длинными концевыми повторами. Помимо обратной транскриптазы этот ретропозон содержит ОРС других ферментов интеграции — *gag*- и *pol*-генов (в их состав входят последовательности, гомологичные протеазе, интегразе, обратной транскриптазе и РНКазе H), типичных для ретроэлементов животных. В пределах LTRs найдены также последовательности, характерные для промоторных участков структурных генов, которые расположены за 20—26 н. п. до точки инициации транскрипции («Goldberg-Hogness box»).

Подобный транспозон класса I обнаружен у возбудителя аспергиллеза — патогена человека (*Aspergillus fumigatus* — *Afut I*). Ретропозон длиной 6914 н. п. с длинными концевыми повторами (282 н. п.) имеет домены, гомологичные обратной транскриптазе, РНКазе H и эндонуклазе, характерные для ретровирусов, и также принадлежит *gypsy*-группе. Однако этот элемент имеет дефект функции за счет многочисленных стоп-кодонах (мутации типа транзиций — transitions C → G → T → A).

Обнаруженный у шампиньона *Agaricus bisporus* транспозон класса I *Tab1* связан с вариабельностью диких линий гриба. Имеется приблизительно 50 копий в геноме.

Ретроэлемент класса I с длинными концевыми повторами (LTRs), названный «*Grasshopper*», или «кузнечик», обнаружен у возбудителя пирикулярриоза риса *Magnaporthe grisea*. У гриба описано еще одно семейство повторяющихся последовательностей — *MGR586*, диспергированных по всему геному. Как полагают, с присутствием этих элементов в геноме гриба связано явление значительного полиморфизма рестриктов ДНК (RFLPs). Изучая сегрегацию полиморфных рестриктов ДНК, несущих эти последовательности, ученые сделали предположение о том, что эти транспозонподобные элементы вызывают неслучайные хромосомные перестройки, что приводит к гетерокариотическому состоянию ядер в вегетативном мицелии гриба. Позже в пределах этого семейства *MGR586* повторяющихся последовательностей выделили новую группу ретротранспозонподобных элементов с длинными концевыми повторами (LTRs), названную *fosbury*. Еще один ретротранспозон I класса, обнаруженный у *Magnaporthe grisea* и названный *MAGGY* (от *Magnaporthe grisea gypsy*), был способен к гетерологичному переносу, т. е. передавался другим видам грибов, таким, как *Colletotrichum lagenarium*, *Pyricularia zingiberi*, причем частота транспозиций у разных видов была различна (T. Nakayashiki et al., 1999).

Транспозиции осуществлялись через РНК-посредника, а сама последовательность *MAGGY* элемента кодировала две ОРС *gag*- и *pol*- генов.

Транспозоны класса II

К транспозирующимся через ДНК-посредника элементам эукариот принадлежат семейства *hAT*, *Fot1/pogo* и *Tc1/mariner*, обнаруженные в различных царствах эукариот. Следует заметить, что транспозоны II класса также широко встречаются среди мицелиальных грибов. Члены семейства *hAT* имеют характерные дупликации сайтов-мишеней (TSD) в 8 н.п., возникающих в сайтах их интеграции, и гомологии ак-последовательностям (аминокислотным последовательностям) транспозаз. К семейству *hAT* относятся недавно обнаруженные: *Abr1*-элемент *Agaricus bisporus*, *Folyt1*-транспозон *Fusarium oxysporum*, *restless*-элемент *Tolypocladium inflatum*, *scooter*-элемент *Schizophyllum commune*, *Ascot-1* *Ascobolus immersus*. Транспозон *Ascot-1* был изолирован из мутантной аллели локуса *b2*, отвечающего за окраску аккоспор. Но в отличие от типичных элементов *hAT*-семейства *Abr1* не кодирует свою собственную транспозазу и имеет нетипичный TSD в 7 н.п.; по-видимому, он неактивный (не может перемещаться автономно), хотя и стабильно наследуется у культивируемых штаммов шампиньона.

Scooter-транспозон — это первый мобильный элемент из семейства *hAT* с TSD в 8 н.п. и инвертированными повторами в 32 н.п., обнаруженный у базидиального гриба *Schizophyllum commune*. Был описан как инсерционная мутация в генах, нарушающих половые скрещивания. Две почти идентичные копии (*scooter-1* и *scooter-2*), способные активно перемещаться, встречались практически у всех проанализированных штаммов гриба. *Scooter-1* сначала был обнаружен как вставка в локусе *B β 2*, а именно в гене рецептора феромона — *bbr2*, приводящая к частичному нарушению при половом спаривании. *Scooter-1* был способен время от времени вырезаться из *bbr2*-локуса рецептора феромона, что всегда сопровождалось восстановлением функции *B β 2*-рецептора. *Scooter-2*-транспозон прерывал ген *thin1* (вызывал gene disruption), что фенотипически проявлялось как морфологическая мутация *thin* — быстро растущие мицелиальные сектора на фоне нормального роста колоний. Показано, что ген *thin1* кодирует регулятор сигнального G-белка (RGS-белок — *regulator of G signaling protein*) и участвует в регуляторной цепи передачи ассоциированных с G-белками трансмембранных сигналов, что в свою очередь регулирует экспрессию гидрофобиновых генов. Рецептор феромонов, спаренный с G-белком, передает внутриклеточный сигнал через каскад MAP-киназы, что ведет к индукции морфогенетических

генов. У мутантов *thin* наблюдали снижение синтеза или полное отсутствие в цитоплазме мРНК, кодирующих гидрофобины. Прерывание (*disruption*) гена *thin1* имело плеiotропный эффект, связанный с вегетативным ростом и половым развитием гриба.

В изящных экспериментах американские исследователи Т. Фоулер с соавт. высказали предположение о том, что транспозирующие элементы *scooter* влияют на сигнальную систему, опосредованную белковыми взаимодействиями, что в свою очередь приводит к регуляции путей бесполого развития или формирования плодовых тел у *S. commune*. Спонтанные инсерции *scooter* в гены с проявляющимися мутантными фенотипами представляют первое свидетельство активных транспозиций ДНК-опосредованных транспозонов у базидиомицетов. Ввиду относительно короткой длины этих МЭ у них отсутствуют протяженные ОРС, способные кодировать собственные транспозазы; мобильность элементов обеспечивается транспозазами, закодированными где-то еще в геноме *S. commune*.

Мобильный элемент *restless* из семейства *hAT*-транспозонов обнаружен у продуцента иммуносупрессорного циклического белка циклоспорина — гриба *Tolypocladium inflatum*. Его длина 4,097 тыс. н.п.; он имеет инвертированные концевые повторы в 20 н.п. и сайты-мишени дупликаций в 8 н.п. Рамка считывания прерывается интронной последовательностью; считывается два полипептида (157 и 803 ак), один из которых (803 ак) гомологичен транспозазам. Все семь хромосом гриба, разделенные электрофорезом в пульсирующем поле, несут копии этого транспозона, т.е. 15 копий транспозона диспергированы по гаплоидному геному. С помощью «ловушек транспозонов» (*transposon traps*), используя мутанты по гену нитратредуктазы (*nia*), было показано, что это активный транспозон, способный вырезаться и интегрироваться в новые локусы генома. У других проанализированных штаммов (непродуцентов) этот транспозон не обнаружен.

Анализ *Ds*-подобного транспозона *Ascot1* у *Ascobolus immersus* предполагает связь между реакцией вырезания транспозонов *hAT*-семейства и *V(D)J*-рекомбинацией (разновидностью эктотипической рекомбинации) (см. гл. 3). При вырезании транспозонов класса II разрыв по 5'-концу элемента происходит не строго по концевому нуклеотиду, а образующиеся при этом бреши редко восстанавливают исходную оригинальную последовательность. Это обеспечивает высокий уровень вариабельности ДНК последовательностей в участках вырезания транспозонов.

Различные фенотипические и генетические проявления от вырезания транспозона *Ascot1* были продемонстрированы на нестабильном локусе окраски аскоспор — *b2*. Было идентифицировано 48 различных молекулярных продуктов, образующихся вследствие вырезания транспозона. Эти продукты различались по частоте по-

явления, и большинство из них имели дополнительные короткие палиндромные нуклеотидные последовательности в местах образования брешей (незаполненных сайтов), примыкающих к 5'-концам транспозона, причем, как было показано, они не синтезировались по матрице комплементарной цепи образовавшейся брешы. Авторы объяснили этот факт тем, что вырезание и репарация пустых сайтов сопровождалась не простым механизмом соединения концов (end-joining reaction), а параллельно с вырезанием происходила V(D)J (эктотипическая) рекомбинация, сопровождаемая образованием шпилечных промежуточных структур, на что и указывает образование палиндромов на концах. Палиндромные последовательности, возникающие в результате V(D)J рекомбинации, являются дополнительным источником вариабельности, обеспечивают спектр спонтанных мутаций.

Интересными являются также данные о частоте появления тех или иных типов продуктов, свидетельствующие о том, что дальнейшая судьба транспозона после вырезания связана с процессингом в сайте вырезания, т.е. от того, какие перестройки происходят в сайте вырезания транспозона. Показано, что V(D)J-рекомбинация — это процесс, затрагивающий соматические клетки, происходит преимущественно в последнем митотическом цикле перед мейозом у *Ascobolus*.

Несколько различных транспозонов из класса II обнаружено у возбудителя вилта (увядания) культурных растений (хлопчатника, льна, овощных) *Fusarium oxysporum*. Например, *Fot1*-элемент был обнаружен как инсерция по гену нитратредуктазы — *niaD*; это относительно короткая последовательность в 1,9 тыс. н.п. с инвертированными повторами на концах в 44 н.п. (Т. Langin, М. Daboussi). Элемент кодирует *транспозазу* и встречается у различных специализированных форм и рас гриба, причем дивергенция нуклеотидных последовательностей между специализированными формами не превышает 1 %; следовательно, этот элемент уже присутствовал у предковых изолятов до специализации гриба по растениям-хозяевам. В геномах различных рас гриба может встречаться от 1 до 100 копий *Fot1*-элемента, что было показано в экспериментах по гибридизации с диспергированными по геному *Fusarium* повторами при использовании *Fot1*-последовательности как зонда. Показано значительное сходство *Fot1* с классом *Tc1*-транспозонов.

У *Fusarium oxysporum* обнаружено семейство транспозоноподобных элементов класса II — *impala*. Впервые они были изолированы у нестабильных мутантов по *niaD*-локусу (гену нитратредуктазы) (Т. Langin, Р. Capu, М. Daboussi, 1995). Это ДНК-транспозон протяженностью 1280 н.п. с инвертированными повторами на концах (ITRs) в 27 н.п. (TA insertion specificity), принадлежит семейству *Tc1*-элементов, впервые описанных у *Xenopus levis*.

Impala-последовательность кодирует транспозазу; однако не все копии в геноме способны автономно реплицироваться, некоторые из них дефектны за счет прерывания последовательностей несколькими стоп-кодонами. *Impala*-элементы образуют семейство, разделенное на 4 подсемейства, характеризующиеся различной степенью дивергенции: полиморфизм между подсемействами составляет от 9 до 30 %. Как и *Fot1*, эти элементы обнаружены почти у всех специализированных форм *Fusarium*. Надо особо подчеркнуть, что оба эти элемента — *impala* и *Fot1* — способны к транспозиции с высокой частотой и некоторые их копии могут существовать автономно. Это одна из первых находок (1996) автономных транспозонов у мицелиальных грибов.

Tfo1-транспозон *F.oxysporum* протяженностью 2763 н. п. с инвертированными повторами на концах (ITRs) в 15 н. п. — еще один представитель класса II, который также кодирует транспозазу, обеспечивающую транспозиции данного элемента с ДНК на ДНК.

Геном другого фитопатогенного гриба, *Pyricularia oryzae* (телеоморфа — *Magnaporthe grisea*), чрезвычайно вариабельного возбудителя пирикулярриоза риса, буквально «нашпигован» различными МЭ. Например, элемент *Pot2* гриба, впервые обнаруженный у дискомицетов и названный *Flipper*, имеет инвертированные концевые повторы (ITRs) в 43 н. п., а его протяженность составляет 1857 н. п. *Pot2* имеет ОРС-транспозазы с высокой степенью гомологии с *Fot1*-элементом. Имеется приблизительно 100 копий на гаплоидный геном. У *Magnaporthe* в пределах *Pot2*-элемента находятся короткие (470 н. п.) повторяющиеся последовательности со свойствами типичных *SINE*-элементов (*short interspersed repeat sequences*) — *Mg-SINE*, которые, вероятно, были амплифицированы в результате многократных транспозиций. *Mg-SINE* обнаружены не только в пределах *Pot2*-элемента, но и в других участках генома на всех хромосомах; это своеобразные диспергированные повторы. Они найдены у штаммов, изолированных из растений риса и других злаков. У них отсутствуют ясно выраженные открытые рамки считывания, однако их транскрипты обнаружены в цитоплазме. РНК-транскрипты имеют типичную для тРНК структуру кленового листа с некоторыми модификациями по спаренным нуклеотидам. Очевидно, *SINE*-элементы для собственной транскрипции используют обратнотранскриптазную активность других ретроэлементов. По типу транспозиции их можно отнести к I классу. Поскольку *Mg-SINE* встречаются у «рисовых» и «нерисовых» штаммов, полагают, что это предковый элемент, возникший в геноме гриба до его специализации по растениям-хозяевам.

В качестве справки заметим, что *SINE*-элементы — это короткие диспергированные повторы длиной 100—500 н. п. Полагают, что *SINE* представляют собой процессированные псевдогены, происходящие от генов класса III, транскрибируемых с помощью

РНК-полимеразы III. Например, гены класса III кодируют малые цитоплазматические РНК, в частности тРНК, а последовательности *SINE* гомологичны последовательностям соответствующих РНК-генов. Типичным для *SINE*-элементов является наличие промотора РНК-полимеразы III и прямых повторов на концах, которые являются сайтами-мишенями дупликаций (TSD); они содержат также А-обогащенную 3'-концевую последовательность.

Транспозиция *SINE*, очевидно, осуществляется путем обратной транскрипции с участием РНК полимеразы III: *SINE* транскрибируются в кДНК копии, которые интегрируются в геномную ДНК. Показано, что их встраивание в новые геномные участки приводит к нарушениям РНК-последовательностей (truncation), изменению полиаденилирования РНК и модифицированию белковых структур. Они обнаружены в интронах, некоторые из них фланкируют гены; встречаются также в сателлитных ДНК и в составе кластеров вместе с другими инсерционными последовательностями.

LINE (long interspersed repeats), о которых упоминалось ранее в главе, — это тоже диспергированные повторы, но их длина достигает 6 тыс. н.п. и более. Они так же, как и *SINE*-последовательности, часто бывают фланкированы прямыми повторами, которые, вероятно, служат сайтами-мишенями дупликаций (TSD); на их 3'-конце также имеется аденозинобогатая последовательность (так называемый А-хвост, или A-track). Но в отличие от *SINE*, *LINE*-последовательности не являются псевдогенами каких-либо генов, а представляют собой типичные мобильные элементы класса I, чья амплификация и интеграция в новые геномные сайты произошли в результате обратной транскрипции с соответствующих РНК.

Транспозоноподобный элемент класса II, обнаруженный у мутантного по гену нитратредуктазы, — *niaD*, штамма возбудителя серых гнилей *Botrytis cinerea*, назван *Flipper*. Его протяженность составляла 1,8 тыс. н.п. с инвертированными повторами 48 н.п. на концах и одной ОРС, гомологичной транспозазе. Среди штаммов *Botrytis* наблюдали варьирование по числу копий на геноме — от 0—20 копий. Было обнаружено значительное структурное сходство с *Pot2*-транспозоном *M.grisea* и *For1*-элементом *F. oxysporum*.

Интересной оказалась находка у мутантов по гену нитратредуктазы *niaD Aspergillus niger var. awamori* транспозоноподобных элементов *Vader* в 437 н.п. с инвертированными концевыми повторами в 44 н.п. Число копий на геноме не превышало 15. Понятно, что столь короткая нуклеотидная последовательность (437 н.п.) не способна кодировать полноценную белковую последовательность, и, как результат, в пределах данного *Vader*-элемента не было обнаружено никаких ОРС. Однако мобильность *Vader*-копий была опосредована транспозазной активностью другой пос-

ледовательности — *Tan1*, длиной 1668 н. п., имеющей только одну копию в геноме гриба, но несущей ОРС-транспозазы, которая и обеспечивала транспозиции *Vader*-элементов. Показано, что последовательности *Vader* и *Tan1* образуют общий кластер. Таким образом, в геноме гриба имеются одна копия *Tan1* и несколько мобильных копий *Vader*, диспергированных по всему геному. *Tan1* имеет до 30 % гомологий в нуклеотидных последовательностях с *Pot2* *M. grisea* и *Fot1* *F. oxysporum*. Примеры обнаруженных в грибных геномах транспозонов приведены в табл. 3.

Таблица 3. Встречаемость транспозонов различных классов в геномах грибов

Транспозоны класса I	Транспозоны класса II
ДНК → РНК → ДНК	ДНК → ДНК
ОРС: гены <i>RT</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i> . Повторы — LTRs	ОРС: <i>TPase</i> . Повторы — ITRs
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<i>Ty1</i> — 5,9 тыс. н. п., 330 н. п. LTRs, <i>RT</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i>	
<i>Ty3</i> — 4,748 тыс. н. п., 340 н. п. LTRs, <i>RT</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i>	
<i>Ty4</i> — 6,2 тыс. н. п., LTRs, <i>RT</i> <i>gag</i> , <i>pol</i>	
<i>Neurospora crassa</i>	
<i>Tad1</i> — 7 тыс. н. п., non-LTRs, <i>RT</i>	<i>Punt</i> ^{RIPI} — 1,9 тыс. н. п.
<i>Tcen</i> — <i>copia</i> -подобный, LTRs, <i>RH</i>	
<i>Tgl1</i> , <i>Tgl2</i> — <i>gypsy</i> -подобные	
<i>dab1</i>	
<i>Fusarium oxysporum f.spp.</i>	
<i>Skippy</i> — 7,846 тыс. н. п., 429 н. п. LTRs, <i>RT</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i>	<i>Fot1</i> — 1,9 тыс. н. п., 44 н. п. ITRs, <i>TPase</i> , 1 — 100 копий
	<i>Impala</i> — 1,28 тыс. н. п., 27 н. п. ITRs, <i>TPase</i>
	<i>Folyt1</i> — 2,615 тыс. н. п., 9 н. п. ITRs, 8 н. п. TSD, <i>TPase</i>
	<i>Tfol</i> — 2,763 тыс. н. п., 15 н. п. ITRs, <i>TPase</i>
<i>Nectria haematococca (Fusarium solani f. sp. pisi)</i>	
	<i>Nht1</i> — 2,198 тыс. н. п., ITRs, <i>TPase</i> , 1 — 100 копий

Транспозоны класса I	Транспозоны класса II
<i>Magnaporthe grisea (Pyricularia oryzae)</i>	
<i>MAGGY</i> — <i>gypsy</i> -подобный, <i>gag</i> , <i>pol</i>	<i>Pot2</i> — 1,857 тыс. н.п., 43 н.п. ITRs, <i>TPase</i> , 100 копий
Grasshopper	<i>Mg-SINE</i> — 470 н.п.
<i>MGRL-3</i> — 6 тыс. н.п., LTRs	<i>MGR586</i> — 1,86 тыс. н.п., 42 н.п. ITRs
Fosbury — LTRs	
<i>Aspergillus niger var. Awamori</i>	
	<i>Tan1</i> — 1,668 н.п., <i>TPase</i> , 1 копия
	<i>Vader</i> — 437 н.п., 44 н.п. ITRs, 15 копий
<i>Aspergillus fumigatus</i>	
<i>Afut1</i> — 6,914 тыс. н.п., 282 н.п. LTRs, <i>RT</i> , <i>RH</i>	
<i>Cladosporium fulvum</i>	
<i>CFT1</i> — 6,968 тыс. н.п., 427 н.п. LTRs, <i>RT</i> , <i>gag</i> , <i>pol</i>	
<i>Botrytis cinerea</i>	
	<i>Flipper</i> — 1,842 тыс. н.п., 48bp ITRs, <i>TPase</i> , 0—20 копий
<i>Ascobolus immersus</i>	
	<i>Ascot1</i> — 409 н.п., 25 н.п. ITRs
<i>Podospora anserina</i>	
	<i>Pat</i> — 1,856 тыс. н.п., 53 н.п. ITRs, 20—25 копий, <i>RIP</i>
<i>Agaricus bisporus</i>	
<i>Tab1</i> , <i>Tab2</i> — 850 н.п. LTRs, > 50 копий	<i>Abr1</i> -из <i>hAT</i> , ITRs, 7 н.п. TSD
<i>Schizophyllum commune</i>	
	<i>Scooter</i> — из <i>hAT</i> , 32 н.п. ITRs, 8 н.п. TSD, <i>TPase</i>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	
	<i>Pcc1</i> — 1,747 тыс. н.п., ITRs, 4 копии
<i>Tolypocladium inflatum</i>	
	<i>Restless</i> — из <i>hAT</i> — 4,097 тыс. н.п., 20 н.п. ITRs, <i>TPase</i> , 15 копий

Участие транспозонов в патогенезе

Сейчас пытаются связать наличие транспозонов в геномах грибов с их патогенностью. Например, получены косвенные данные о возможном участии транспозонов в патогенезе возбудителя гельминтоспориоза кукурузы *Cochliobolus carbonum*. За патогенность штаммов на кукурузе отвечает НС-токсин, представляющий собой циклический полипептид, секрция которого контролируется дублированной последовательностью ДНК *Tox2*-локуса (22 тыс. н. п.). Эта область фланкирована повторяющимися элементами, гомологичными транспозонам *Fot1* *F. oxysporum* и *Pot2* *Magnaporthe grisea*. У резистентных растений вырабатывается НС-токсинредуктаза (*HCTR* — продукт гена *Hm1*), инактивирующая НС-токсин.

У растений показано накопление некоторых транспозонов в их геномах в ответ на внедрение грибного патогена. Например, *Rim2*-транскрипт накапливается в растениях риса как в случае совместимых, так и несовместимых взаимодействий между растением и патогеном *Magnaporthe grisea*. *Rim2*-транскрипт имеет гомологии с *САСТА*-транспозонами других растений.

У фитопатогенного гриба гороха *Nectria haematococca* (анаморфа *Fusarium solani* f. sp. *pisi*) показано наличие В-хромосом, нестабильных во время полового воспроизведения. Чаще всего В-хромосомы грибов инертны, т. е. их последовательности не транскрибируются, как, например, у патогена риса *Magnaporthe grisea*. Однако в некоторых случаях гены, расположенные на В-хромосомах, непосредственно участвуют в патогенезе, играют роль во взаимодействиях хозяин — патоген. Эти хромосомы у патогена гороха несут гены, ответственные за детоксикацию фитоалексинов растения-хозяина, что значительно повышает патогенность данного гриба. Например, В-хромосома размером 1,6 тыс. н. п. имеет два гена — *Pda6* и *Mak1*, непосредственно участвующие в патогенезе. *Pda6*-ген кодирует фермент из семейства цитохромных генов P450 (монооксигеназ), который повышает вирулентность штаммов гриба на горохе за счет того, что продукт *Pda6*-гена инактивирует основной защитный фитоалексин гороха — пизатин. *Mak1*-ген контролирует синтез фермента, инактивирующего другой фитоалексин — медикарпин. На одной из этих хромосом были обнаружены повторы ДНК, содержащие транспозоноподобный *Nht1*-элемент (II класса), длиной 2198 н. п. и с инвертированными концевыми повторами. Элемент содержит два интрона и кодирует белок в 550 аа (аминокислотных последовательностей), высоко гомологичный транспозазе *Fot1*-элемента. В пределах северо-американской популяции гриба *Nht1*-транспозон встречается неравномерно. У различных природных изолятов число копий варьирует от 0 до 100 на 1 геном. У штамма, у кото-

рого он был обнаружен, имеется шесть копий этого элемента на нестабильной хромосоме.

Получены также начальные сведения о факторах, способных активизировать мобильность грибных транспозонов. Показано, что у *F. oxysporum f. sp. lycopersici* имеется *skippy (skp)*-элемент в 7846 н.п. с длинными повторами LTRs в 429 н.п., который принадлежит *gypsy*-группе ретроэлементов I класса. Под влиянием стрессовых условий среды индуцировали транспозиции этого элемента. Во время роста гриба в присутствии хлората калия в среде отбирали мутанты, устойчивые к хлорату и дефектные по гену нитратредуктазы *niaD*. При сравнении дикого исходного фенотипа с тремя отобранными мутантами было обнаружено, что мутанты содержали тандемные копии *skp*-последовательностей в новых участках генома, т.е. *skp*-элементы интегрировались в новые сайты, и одновременно происходила потеря резидентных *skp*-элементов, имеющих у дикого типа. Индукция транспозиций *Ty1*-элементов происходила под действием осмотического стресса, нехватки азота в среде и повышенных температур.

Механизмы защиты от чрезмерных транспозиций и поддержание интегративной целостности геномов

Процессы, ответственные за пластичность геномов, в том числе и транспозиции МЭ, несомненно, предоставляют видам много преимуществ, увеличивая их шансы на выживание и адаптацию в изменяющихся условиях окружающей среды. Транспозиции мобильных элементов выступают весьма динамичной силой генома, нарушая кодирующие последовательности генов (*gene disruption*), изменяя экспрессию соседних генов, облегчая крупные хромосомные перестройки. Однако слишком высокий уровень изменчивости и мутабельности может становиться с какого-то момента вредным. Слишком частые перемещения мобильных элементов могут привести к дезинтеграции генома, к нарушению его целостности. Не вызывает сомнений, что негативные эффекты действия транспозонов сопровождались одновременной эволюцией механизмов контроля за их активностью.

Одним из таких механизмов контроля активных транспозиций мобильных элементов является *RIP-процесс (repeat induced point mutation)*, связанный с накоплением точечных мутаций в кодирующих последовательностях транспозонов. На *Neurospora crassa* показано, что дублицированные ДНК-последовательности эффективно обнаруживаются и подвергаются изменениям (модификациям) во время полового цикла в момент кариогамии при участии *RIP*-процесса — индуцированных в повторах точечных мутаций (транзиций) нуклеотидов GC к AT. При этом *RIP*-мутации

наблюдаются у нейроспоры в последовательностях длиной не менее 400 н. п., т. е. более протяженные дупликации гораздо эффективнее подвержены мутированию. *RIP* фактически снижает гомологии между дупликациями, тем самым уменьшая вред от накопления дупликаций, так как при этом снижается вероятность гомологичных обменов, приводящих к крупным хромосомным перестройкам. *RIP* происходит до или во время премейотического синтеза ДНК на обеих цепях дуплекса. *RIP*-мутации чаще всего являются молчащими, но могут возникать нонсенс- и миссенс-мутации, а также функционально мутантные аллели.

В нескольких работах на примере *Tad*-элемента из группы LINE *Neurospora crassa* было показано, что активно транскрибируемые перемещающиеся *Tad*-последовательности имеются только у штамма *Adiopodoume*, в то время как у других штаммов почти все копии *Tad* неактивны. Экспериментально было показано, что активный *Tad*-транспозон быстро элиминировался в половом цикле и что за это был ответствен механизм индуцирования в повторях точечных мутаций — *RIP*, чаще всего транзиций нуклеотидов G-C к A-T. Как заключили авторы, это и есть тот механизм, который «подсчитывает» количество активных транспозонов в геноме. У нейроспоры обнаружен еще один тип повторяющихся последовательностей, представленный семейством дегенеративных ретроэлементов класса I с четкими гомологиями их последовательностей обратным транскриптазам, РНКазам H и эндонуклеазам *pol*-генов, — *dab1* (dead and buried). Эти транспозоны потеряли свою активность (способность обеспечивать собственное перемещение) благодаря *RIP*-процессу, который подтверждается наличием многочисленных замен G-C на A-T (диагностический признак *RIP*). Дефектные *Tad*-копии чаще всего обнаруживают в районах центромер и теломер, где много различных повторов.

Дегенеративные копии *MAGGY*-элементов, подвергшиеся действию *RIP*, были обнаружены у изолятов *Pyricularia oryzae*. Дегенеративный транспозон *Pat* обнаружен также у диких штаммов *Podospira anserina*: длиной 1856 н. п. с несовершенными концевыми инвертированными повторами в 53 н. п.; его ОРС имеет гомологии с рамками считывания транспозаз. Данный транспозон неактивен и дефектен за счет многочисленных стоп-кодонах, возникших в результате *RIP*.

Процессы метилирования ДНК также можно рассматривать как один из возможных механизмов контроля за распространением способных к транспозициям (активных) мобильных элементов. У грибов *Neurospora crassa* и *Ascobolus immersus* продемонстрирован особый механизм маркирования дублицированных последовательностей путем их метилирования. Метилирование последовательностей приводит к нарушению их транскрипции (*transcriptional*

silencing), повышает мутабельность последовательностей и ингибирует рекомбинацию. Это своего рода механизм «уменьшения шумов» в геноме, обеспечивающий молчание избыточных генных копий. Последовательности, модифицированные RIP, обычно являются сигналом для последующего метилирования ДНК, так как последовательности, подвергшиеся RIP-мутированию, могут продолжать транскрибироваться с образованием транскриптов ненормальной длины. Избыток ненужных транскрипций может быть губительным для нейроспоры, поэтому сопряженное с RIP метилирование ДНК будет ингибировать дальнейшую транскрипцию генов, мутировавших в результате RIP. Однако это только лишь предположение о том, что функция метилирования в геноме нейроспоры направлена на «успокаивание» (подавление) транскрипции RIP-модифицированных последовательностей. Более того, экспериментально было показано, что реверсия мутантного гена *am* к дикому типу зависит от степени метилирования ДНК внутри встроенной *Tad*-последовательности, т.е. эпигенетический контроль гена, инактивированного транспозоном, зависит от степени метилирования ДНК.

Таким образом, «транскрипционный механизм молчания» обеспечивается метилированием ДНК, но существует и «посттранскрипционный механизм молчания», вызываемый дестабилизацией РНК. Посттранскрипционный механизм изучался на мутантах *Neurospora crassa*; были идентифицированы участвующие в процессе РНК-зависимые РНК-полимеразы и RecQ-геликазоподобные белки, гомологи которых вовлечены в процессы репарации и рекомбинации ДНК. У дрожжей и человека описаны ДНК-геликазы, функция которых заключается в поддержании стабильности генома и подавлении незаконных рекомбинаций. Последовательности с высокой степенью гомологии этим белкам — RecQ-геликазам — были обнаружены в теломерных участках на концах хромосом *Usatilago maydis*, что, как можно предположить, обеспечивает поддержание стабильности хромосом. Показано также, что Ту-элементы дрожжей в основном сосредоточены в «молчащих» теломерных участках хромосом. Процесс можно также рассматривать как стратегию, приобретенную в ходе эволюции многими семействами мобильных элементов, чтобы минимизировать «разрывы» функциональных генов (*genome disruption*). Это своеобразный и довольно простой механизм защиты от чрезмерной эктотипической изменчивости и поддержания целостности геномов.

По-видимому, именно субтеломерные и теломерные участки хромосом можно рассматривать как своеобразные ниши, которые оккупируются транспозонами с целью снижения вредного влияния последних на геном. Так, в пределах теломерных повторов у зеленой водоросли *Chlorella* в основном сосредоточены рет-

розлементы LINE-семейства; подобное явление обнаружено также у высших растений.

Три различных типа транспозонов обнаружены на специфической теломере рисового патогена *Magnaporthe grisea*: *Pot2*, *Mg-SINE* и новый транспозон с длинными прямыми концевыми повторами *MGLR-3* (длиной 6 тыс. н. п.). Участок теломеры подвергался делециям у спонтанно приобретших вирулентность штаммов патогена.

У грибов и растений подобные области предпочтительной локализации транспозонов обнаружены также и в *центромерных* участках: например в центромерном участке VII хромосомы *Neurospora crassa*. Некоторые повторы являются *coria*-подобными ретроэлементами, названными *Tcen*, и приурочены исключительно к центромерным участкам. В VII центромерном участке имеется также несколько других дегенеративных транспозонов: *gypsy*-подобный *Tgl1*, последовательность которого прерывается двумя крупными инсерциями, гомологичными неполным копиям *Tad*-элемента. Дегенеративные копии *Tad*-элементов обнаружили также в районе центромеры III хромосомы и субтеломерной области IV хромосомы.

Дупликации генов. Семейства генов. Псевдогены

Роль амплификации последовательностей ДНК в эволюции геномов признана многими исследователями. Сходные последовательности в пределах одного генома в принципе могут возникать как независимо, так и при копировании исходной уникальной ДНК-последовательности. За амплификацию последовательностей в составе кластеров или последовательностей, рассеянных по новым геномным локусам, отвечают разные механизмы. Амплификацию ДНК-последовательностей могут вызывать мобильные транспозоны, что в дальнейшем может привести к образованию псевдогенов. *Псевдогены* — это потерявшие промоторные участки генные последовательности. Псевдогены могут возникнуть также в результате tandemных дупликаций, произошедших вследствие неравного кроссинговера. Полагают, что так произошли кластеры генов рРНК, tandemно повторяющиеся в геноме грибов от десятков до сотен раз (рис. 13).

Итак, дублицированные гены могут быть подвержены дальнейшему мутированию с образованием псевдогенов. Далее эти «дремлющие» псевдогены могут активизироваться мобильными элементами, как это было экспериментально показано для *E.coli*. Вероятно, не случайно в семействе лигнинпероксидазных генов трутового гриба *Phanerochaete chrysosporium*, состоящем из 10 генов, обнаружен транспозоноподобный элемент *Pce1* в первом

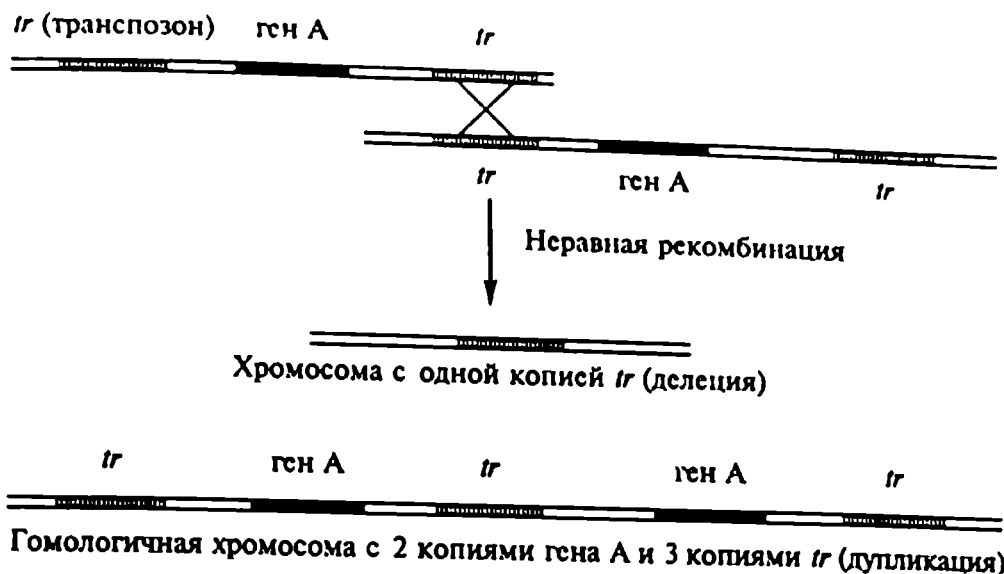


Рис. 13. Формирование дупликаций и делеций.

Процесс может происходить путем неравной рекомбинации между гомологичными хромосомами по участкам, несущим транспозоны, в результате чего образуются две гомологичные хромосомы с перестройками: одна — с делецией, другая — с дупликацией

lip12-гене. Десять *lip*-генов расположены на трех хромосомах, причем 8 из них тесно сцеплены. Вставка *Pce1* в 1747 н.п. с инвертированными концевыми повторами (класс II), примыкающая к четвертому интрону гена *lip12*, инактивирует транскрипцию данного гена, однако аллельный гомолог этого гена *lip11* в диплоидных клетках не подвержен действию данного транспозона. В пределах этого элемента не обнаружено никаких ОРС. С помощью анализа сегрегации и гибридизации по Саузерну показано, что геном гриба содержит 4 копии *Pce1*-подобных элементов с 98 % гомологий между ними (и это удивительно, так как ни одна копия не имеет протяженных рамок считывания). Местонахождение этих транспозоноподобных элементов в геноме не случайно, и все они локализованы на одной хромосоме в 3,7 Mb. Восемь *lip*-генов также расположены на этой хромосоме. Три копии сцеплены друг с другом, но только одна *Pce1*-копия связана с геном, вовлеченным в лигноцеллюлозную деградацию. Локализацию всех копий на одной хромосоме, вероятно, можно объяснить амплификацией последовательностей в результате неравных кроссинговеров между повторяющимися элементами. Функцию этого элемента продолжают изучать. Различные *lip*-гены гриба дифференцированно экспрессируются в ответ на стрессовые условия среды. Например, гены *lip2* и *lip5* активизируются в условиях нехватки азота и углерода в среде. Гены имеют 8—9 интронов длиной 50—62 н.п.

Семейства генов обнаружены и у других грибов. Например, у трутового гриба *Polyporus pinsitus* (возбудителя бурой гнили) об-

наружено 5 лакказных генов *lcc1-5*; все они содержат от 8 до 11 интронов, причем положение ряда интронов консервативно у всех пяти генов. Два лакказных гена, тесно сцепленных между собой, обнаружены у шампиньона *Agaricus bisporus*, вешенки *Pleurotus ostreatus*, у вызывающего белую гниль трутового гриба *Trametes villosa*. Семейство генов кислой фосфатазы у дрожжей насчитывает 4 или более как сцепленных, так и диспергированных генов; причем регуляция генов осуществляется по-разному: один ген репрессируется фосфором, второй им индуцируется, третий — конститутивный. У биотрофного аскомицета спорыньи *Claviceps purpurea* два полигалактуроназных гена *pg1* и *pg2* высокоомологичны, тесно сцеплены между собой и расположены тандемно друг за другом. Тандемные повторы часто обнаруживают как между генами, так и в пределах интронных последовательностей. Они могут содержать от двух нуклеотидов и более. Например, повтор 5'-CA содержится во многих геномных локусах и теломерах дрожжей. Тандемные повторы, где бы они ни находились, как правило, связаны с межвидовым полиморфизмом. Происхождение подобной вариабельности можно объяснить неравным кроссинговером между родственными неаллельными повторами или «проскальзыванием» при репликации. Многие диспергированные повторы, на долю которых может приходиться от 2—9 % ДНК в геноме, представлены мобильными элементами длиной в несколько тысяч нуклеотидных пар.

Дупликации могут затрагивать структурные части генов, при которых структурные последовательности удваиваются с потерей кодонов-терминаторов. В результате подобных дупликаций возникают гены, кодирующие полипептиды, состоящие из повторенных участков аминокислотных последовательностей. Так возникают *мультифункциональные белки*. Примером может служить мультифункциональный полипептид *arom N.crassa* с молекулярной массой 150 000 Да (дальтон), который обладает сразу пятью ферментативными активностями, участвующими в последовательных этапах биосинтеза ароматических аминокислот. Это уникальная находка для биотехнологических процессов.

У многих видов грибов обнаружен полиморфизм по длине и количеству хромосом, описаны минисаттелитные хромосомы, или *В-хромосомы*. Причем этот полиморфизм может быть следствием как митотических, так и мейотических делений. Хромосомный полиморфизм обнаруживают с помощью электрофореза в пульсирующем поле (так называемый CHEF). Недавние исследования показали, что наличие *В-хромосом* у грибов часто не проявляется фенотипически, а сами *В-хромосомы* состоят из повторяющихся последовательностей и некоторых генов, которые инертны и не транскрибируются, как, например, у *Magnaporthe grisea* и *Colletotrichum gleosporium*. Однако известны случаи, когда гены,

расположенные на В-хромосомах, участвуют в патогенезе и играют важную роль во взаимодействии хозяин-патоген, как, например, описанный выше случай наличия у фитопатогенного гриба гороха *Nectria haematococca* (анаморфа *Fusarium solani* f. sp. *pisi*) на В-хромосоме (в 1,6 Mb) двух функциональных генов *Pda6* и *Mak1*, непосредственно участвующих в патогенезе.

В экстремальных условиях у грибов могут происходить абберации хромосом, связанные с потерей целых хромосом и приводящие к гетероплоидности ядер: например, описанная в экспериментах потеря хромосом длиной 960 тыс. н.п. в результате теплового шока у возбудителя головни *Ustilago hordei*.

Мобильные элементы митохондриальных геномов. Плазмиды

Митохондриальный геном грибов представлен циклической молекулой ДНК без гистоновых белков, характерных для эукариотической ядерной ДНК. Размеры митохондриальных геномов малы по сравнению с ядерными и могут значительно различаться среди организмов. Варьирование в размерах в основном обеспечивается за счет некодирующих последовательностей, таких, как интроны и межгенные области, причем многие интроны кодируют белки, обеспечивающие их сплайсинг и мобильность. Например, мт-ДНК дрожжей состоит примерно из 85 тыс. н.п., у *Podospora anserina* — более 100 тыс. н.п. (табл. 4). Гены, кодирующие структурные белковые компоненты митохондрий, локализованы в ядре. Однако несколько белков кодируются неядерной ДНК и синтезируются на особых рибосомах митохондрий. Таким образом, органеллы (митохондрии и хлоропласты) — это результат объединенных усилий двух геномов и двух трансляционных аппаратов. РНК-компоненты рибосом, а также тРНК, используемые при трансляции, кодируются геномами митохондрий и хлоропластов. В митохондриях имеется свой стандартный набор генов: гены ферментов дыхательной цепи, участвующие в процессах окислительного фосфорилирования, гены рРНК, тРНК, гены АТФаз. Например, мт-геном дрожжей в основном представлен некодирующими участками и следующими генами: два гена рРНК (большой и малой субъединиц *LrRNA* и *SrRNA*), 25 генов тРНК и 26 последовательностей, кодирующих полипептиды, участвующие в окислительном фосфорилировании (рис. 14).

Репликация кольцевых молекул мтДНК происходит по принципу катящегося кольца и не связана с клеточным циклом (рис. 15).

Митохондриальные геномы, как и ядерные, также демонстрируют присутствие разнообразных мобильных элементов, назы-

Таблица 4. Размеры митохондриальных геномов у организмов из разных царств

Организм	Размер митохондриальной ДНК, н. п.
<i>Pichia canadensis</i> (дрожжи)	27 694
<i>Schizosaccharomyces pombe</i> (дрожжи)	19 431
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)	85 779
<i>Podospora anserina</i> (аскомицет)	100 314
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (зеленая водоросль)	15 758
<i>Paramecium aurelia</i> (простейшие)	40 469
<i>Arabidopsis thaliana</i> (покрытосеменные)	166 924
<i>Brassica hirta</i> (покрытосеменные)	208 000
<i>Cucumis melo</i> (покрытосеменные)	2 400 000
<i>Drosophila melanogaster</i> (насекомые)	19 517
<i>Xenopus laevis</i> (земноводные)	17 553
<i>Mus musculus</i> (млекопитающие)	16 295
<i>Canis familiaris</i> (млекопитающие)	16 728
<i>Homo sapiens</i> (человек)	16 569

ваемых плазмидами. Наряду с транспозонами, интронами и вирусными частицами плазмиды принадлежат к разряду так называемой эгоистической (*selfish*) ДНК. Большинство обнаруженных плазмид локализованы в митохондриальных геномах и чаще всего их наличие в геноме не проявляется фенотипически. Однако описаны также *killer*-плазмиды и плазмиды, связанные с различной вирулентностью и патогенностью штаммов. Плазмиды эукариот в основном встречаются в царстве грибов. Они обнаружены во многих природных популяциях грибов. Возможно, преобладание плазмид среди грибов связано со спецификой их жизненных циклов, физиологией, средой обитания, т.е. можно предположить, что их наличие в геномах обеспечивает грибам некие преимущества в прорастании и распространении.

Плазмиды мицелиальных грибов можно разделить на *три класса* согласно их структуре (линейной или циклической) и наличию гомологии с участками мтДНК:

1) линейные плазмиды, не имеющие гомологий с мт-хромосомой;

2) ковалентно замкнутые циклические олигомерные плазмиды, не имеющие гомологий с мт-хромосомой, могут вызывать синдром старения;

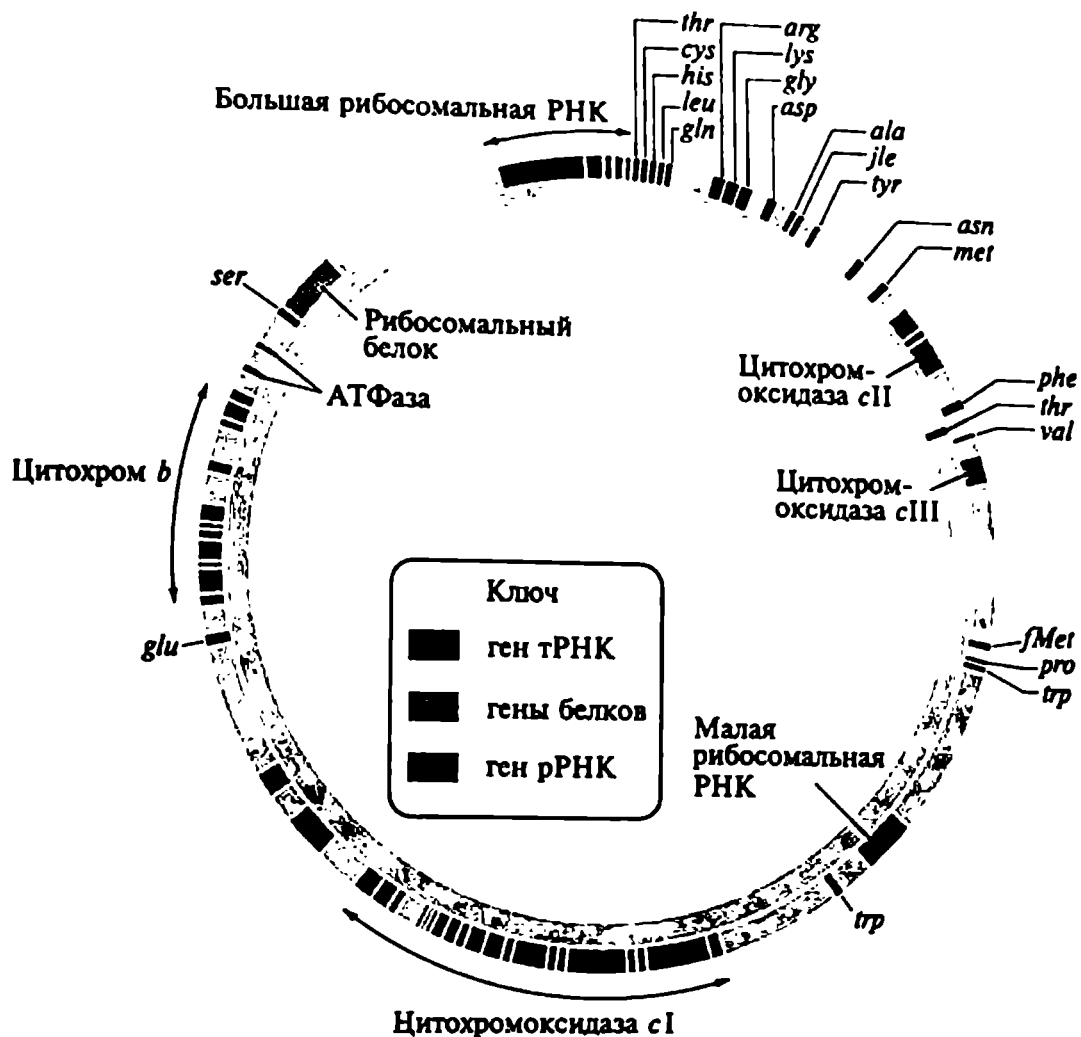


Рис. 14. Митохондриальный (мт) геном дрожжей *S. cerevisiae*, содержащий в основном некодирующие последовательности. Остальные пояснения см. в тексте



3) ковалентно замкнутые циклические олигомерные плазмиды, имеющие гомологии с мт-хромосомой и вызывающие синдром старения (*senescence*).

Линейные мт-плазмиды

Большинство мт-плазмид — это линейные молекулы ДНК с концами, блокированными белками, и со своим собственным циклом размножения и функциями.

Общие характеристики *линейных* мт-плазмид:

- имеют ОРС для ДНК-полимераз (кодируют ДНК-полимеразы); ДНК-полимераза обеспечивает их репликативный синтез;
- некоторые из них кодируют РНК-полимеразы;
- имеют концевые инвертированные повторы *TIR* (*terminal inverted repeats*), а также *терминальные белки*, связанные с 5'-концом ДНК-молекулы, что напоминает некоторые ДНК-содержащие вирусы (аденовирусы). Терминальные белки защищают линейную молекулу ДНК от действия экзонуклеаз.

ДНК- и РНК-полимеразы, кодируемые плазмидами, способствуют их передаче другим митохондриям. Плазмиды характеризуются большим числом копий на геном и стабильностью. Они способны к автономной репликации, т.е. их репликация осуществляется независимо от транскрипции ядерных генов.

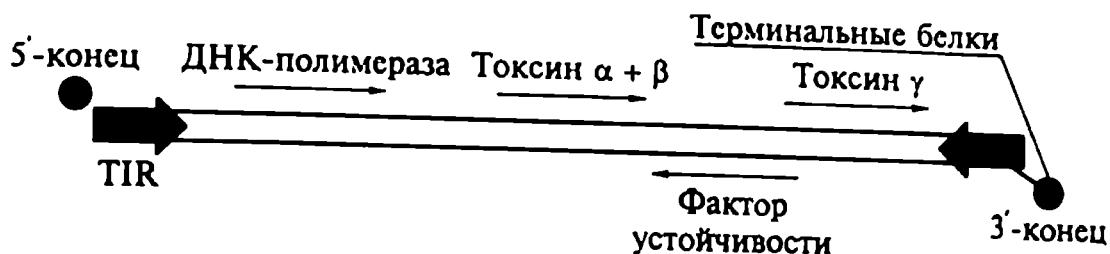
Линейные плазмиды имеют некоторые структурные сходства с линейными плазмидами растений (цитоплазматическая мужская стерильность кукурузы), бактериальными транспозонами и аденовирусами. Хотя линейные плазмиды имеют некоторое сходство с другими линейными экстрахромосомными элементами, функциональных сходств между ними обнаружить пока не удалось.

Бурное изучение мт-плазмид пришлось на конец 70-х—80-е годы прошлого столетия и было связано с поиском векторов, удобных для горизонтального переноса генов. С этой точки зрения перспективными были молекулы ДНК, способные автономно реплицироваться и проявляться фенотипически. Поэтому в поле зрения исследователей часто попадали так называемые киллер-плазмиды (*killer*), имеющие четко выраженное фенотипическое проявление — старение мицелиальных культур.

Много линейных плазмид обнаружено у фитопатогенных грибов. Например, у возбудителя спорыньи *Claviceps purpurea* плазмида *pCIK1*, длиной 6,7 тыс. н.п., имеет две рамки считывания — ДНК- и РНК-полимераз. Есть еще другие типы плазмид различной длины у этого гриба. У возбудителя вилта многих культурных растений, *Fusarium oxysporum*, специализация по хозяевам связана с присутствием различных плазмид, например плазмиды *pFoxL2*.

Плазмиды обнаружены у слабопатогенных штаммов *Rhizoctonia solani*, но отсутствуют у высоковирулентных штаммов. Иногда, наоборот, потеря вирулентности может быть связана с потерей плазмид, как у *Gaeumannomyces graminis*.

Рассмотрим *killer*-плазмиду дрожжей *Kluyveromyces lactis* *pGKL-1*, протяженностью в 8,9 тыс. н.п., с инвертированными концевыми повторами (TIRs) в 200 н.п.:



Эта плазмида линейна и локализована в цитоплазме. Локализация ее в цитоплазме отдельно от митохондрий является основным отличием этой плазмиды от других линейных, локализованных в митондриальных геномах. Плазмида имеет 4 ОРС: ДНК-полимеразы, токсинов $\alpha + \beta$ и γ , фактора устойчивости. Клетки, несущие плазмиду, убивают клетки, ее не имеющие, т.е. плазмида является генетической основой *killer*-фенотипа. Она может экспрессироваться также в гетерологичном хозяине, например *S. cerevisiae*. Плазмида является идеальным объектом для использования ее как вектора при переносе генов из одного организма в другой. Киллер-плазмиды обнаружены также и у возбудителя головни — грибов рода *Ustilago*.

Несколько различных плазмид обнаружено в геномах грибов из рода *Neurospora*, например *kalilo* и *maranhar* плазмиды *N. intermedia*: линейная плазмида *kalilo* длиной в 9 тыс. н.п., с инвертированными концевыми повторами в 1364 н.п.; *maranhar* — 7 тыс. н.п., *TIR* — 600 н.п. Эти плазмиды несут инвертированные концевые повторы и последовательности, гомологичные ДНК- и РНК-полимеразам. Обе плазмиды агрессивно вирулентны, и, как показано, в природных популяциях частоты их встречаемости растут из года в год. *Kalilo*-плазмида (*kal* ДНК) интегрируется в различные участки мт-генома, однако предпочитает ген большой субъединицы рРНК (*LrRNA*) и, как полагают, в месте интеграции инактивирует ряд генов, т.е. происходит *gene disruption* — нарушение транскрипции генов (считывания генетической информации). *Kalilo*-плазмида не видоспецифична и может передаваться другим видам. Частота ее передачи новым клеткам при формировании гетерокарионов невысока, но дефектный мт-геном, несущий эти элементы, подавляет дикий тип и проявляется фенотипически как «синдром старения» культур: после продолжительного вегетативного роста наступает лизис вегетативных клеток

гриба. В природных популяциях нейроспоры с мест пожарищ на Гавайях 30 % штаммов несли «старяющий» фенотип (*kal*ДНК), а через два года в той же популяции было обнаружено уже 47 % штаммов с *kal*ДНК, т.е. *senescent*-фенотип передавался с большой скоростью между вегетативно совместимыми штаммами. *Kalilo*-плазмиды обнаружены также среди природных штаммов *N. crassa* в Африке, Центральной и Южной Америке.

Мт-плазида *pFoxL2* возбудителя вилта культурных растений, *F. oxysporum*, может передаваться горизонтально при слиянии цитоплазм различных штаммов.

Ковалентно замкнутые циклические мт-плазмиды

Второй класс плазмид представлен ковалентно замкнутыми циклическими молекулами, не имеющими гомологий с мтДНК и вызывающие синдром старения культур. Циклические мт-плазмиды описаны у всех видов *Neurospora*. Например, плазида *Varkud* (3,7 тыс. н.п.) обнаружена в природных популяциях *N. intermedia* в Индии, а плазида *Mauriceville* (3,6 тыс. н.п.) выделена из природных штаммов *N. crassa* в Техасе. Несмотря на отдаленное географическое происхождение, обе плазмиды имеют свыше 97 % гомологий в своих последовательностях (практически идентичны). Они были обнаружены при изучении варибельности мтДНК. РНК-транскрипты с рДНК (плазмидной ДНК) кодируют обратную транскриптазу, которая сама производит себе подобную кДНК-копию с р1-транскрипта, следовательно, репликация и интеграция плазмиды в мтДНК осуществляются с помощью обратной транскрипции (по типу α -*sen*-последовательности *Podospora*). Плазмиды *Varkud* и *Mauriceville* по принципу их репликации можно назвать ретроэлементами митохондрий. К тому же обратная транскриптаза этих плазмид похожа на вирусную РНК-зависимую РНК-полимеразу ретровирусов и, по-видимому, это примитивный ретроэлемент, связанный с ранними предками ретровирусов.

У *Neurospora* описаны также циклические мт-плазмиды, кодирующие ДНК-полимеразу: *LaBelle* (4,1 тыс. н.п.), *Fiji* (5,2 тыс. н.п.) и *Harbin-1* плазмиды *N. intermedia*. Все они имеют до 93 % гомологий между собой. Классическим примером циклической плазмиды является 2-мкм плазида *S. cerevisiae*.

Циклическая мт-плазида *pCRY1* обнаружена у возбудителя голландской болезни вязов — гриба *Cryphonectria parasitica*. Циклическая плазида размером 4,2 тыс. н.п. и кодирующая ДНК-полимеразу, была способна передаваться как через анастомозы (горизонтально) между вегетативно совместимыми штаммами гриба, так и со 100%-й эффективностью через конидии (верти-

кально), вызывая во всех случаях снижение патогенности штаммов гриба. При этом аллельные различия в локусах вегетативной несовместимости не всегда подавляли горизонтальную перелачу этой плазмиды. Плазида имеет гомологии с циклическими плазмидами *LaBelle* и *Fiji* нейроспоры.

Третий класс — это *циклические плазмиды*, имеющие гомологии с мт-геномом и вызывающие синдром старения, до некоторой степени сходны с транспозонами, что делает возможным предположить их некую эволюционную связь. Эти плазмиды способны автономно существовать, поэтому, возможно, их стоит рассматривать обособленно от других плазмид. Примером может служить недавно обнаруженная экстрахромосомная ДНК у *P. anserina* *pAl2-1* с характеристиками, типичными для линейных плазмид; она может существовать как в интегрированной в мт-геном форме, так и в автономной циклической. Эта плазида также связана с явлением старения культур (как и *α -sen* ДНК) и способна модулировать продолжительность жизни штаммов: ее потеря приводит к уменьшению продолжительности жизни штаммов, а приобретение, напротив, влечет за собой долгоживущий фенотип, причем все «долгоживущие» штаммы содержат ее как в автономной циклической, так и в интегрированной формах.

Вирусы

DsPHK-содержащие вирусы обнаружены в цитоплазме ряда патогенных грибов, причем их наличие может вызывать как повышенную вирулентность, так и гиповирулентность штаммов. Например, у паразита каштанов аскомицетного гриба *Cryphonectria* (*Nectria*) *parasitica* гиповирулентность штаммов связана с наличием реплицирующихся в цитоплазме *dsPHK* (12712 н.п.), несущих две рамки считывания — РНК-зависимой РНК-полимеразы и АТФ-зависимой хеликазы. Вирусы получили названия *HA1* и *CHV1-713*. Некапсидированные (не покрытые белковыми оболочками) молекулы *dsPHK* способны передаваться через цитоплазму между вегетативно совместимыми штаммами (через анастомозы) независимо от митохондрий. У гиповирулентных штаммов наблюдаются снижение синтеза оранжевых пигментов, подавление конидиеобразования и ослабление секреции лакказ. Передача возможна только между вегетативно совместимыми штаммами гриба.

Распространение этой вирусной РНК в популяции штаммов гриба может быть использовано как биоконтроль распространения болезни каштанов в природных популяциях. Подобные *dsPHK*, связанные с гиповирулентностью и имеющие ОРС РНК-зависи-

мой РНК-полимеразы и АТФ-зависимой хеликазы, обнаружены штаммов *Rhizoctonia solani*, у патогена кукурузы *Fusarium graminearum*. У содержащих вирусную ДНК (размером 7,5 тыс. н.п.) штаммов *Fusarium* наблюдали ограниченный рост мицелия, повышенную пигментацию, снижение вирулентности и уменьшение в 60 раз уровня секреции микотоксина трихотецина.

У *Neurospora* обнаружили ss-циклическую мт-РНК (вирусоподобную), способную к автономному сплайсингу по аналогии с интронами группы I: это 881 н.п.-рибозим, названный *VSRNA*. Имеется также малое число копий *dsRNA*, колинеарных к *VSRNA*. Как происходит репликация этих частиц, — пока не ясно, хотя и обнаружено сходство с интронами, способными к автономному сплайсингу. Однако интеграция этих частиц в геномную ДНК не была продемонстрирована экспериментально.

DsPHK-вирусная последовательность у *Agaricus bisporus* — вставка по гену лакказы *lcc1*, связана с так называемой *La France* болезнью шампиньонов — побурением плодовых тел. У другого коммерчески важного базидиомицетного гриба, *Flammulina velutipes*, широко культивируемого в Японии, также обнаружена *dsPHK*, влияющая на окраску плодовых тел, что снижает их коммерческую ценность. У *Fusarium poae* — продуцента трихотецина — все штаммы, способные секретировать трихотецин, содержали вирусоподобные частицы *dsPHK*. У этих же штаммов выделили клон кДНК *ZIT1* в 1209 н.п., представленный умеренно повторяющимися последовательностями; секвенирование показало гомологии некоторых повторов с транспозоноподобными структурами.

Таким образом, за последние 25 лет коренным образом изменился взгляд на явление фенотипической и генотипической нестабильности у грибов. Нестабильность может быть связана с частыми перемещениями транспозонов, с пересортировкой различных цитоплазматических элементов, с потерей В-хромосом, несущих гены авирулентности и т.д.

Ядерный статус грибов

Грибы из различных таксономических групп различаются как жизненными циклами, так и плоидностью ядер в вегетативной и репродуктивной фазах. Все возможные варианты ядерного статуса грибов представлены в табл. 5.

Так, гомокарион может быть монокарионом, дикарионом или мультикарионом в зависимости от количества ядер в клетках вегетативного мицелия, в то время как гетерокариотичные ядра могут быть у гриба с дикариотичным или мультикариотичным мицелием. Гетерокариотичные ядра в мицелии могут быть и гап-

Таблица 5. Ядерный статус грибов

Содержание статуса грибов			
Число ядер в клетке	Монокарион	Дикарион	Мультикарион
Состав ядер	Одинаковый — гомокарион		
		Различный — гетерокарион	
Число наборов хромосом	1n — гаплоиды 2n — диплоиды более 2n — полиплоиды		
Состав хромосом	Гомозиготы. Гетерозиготы		

лоидными, и диплоидными, и даже полиплоидными. Дикарион может быть гетерокарионом с гетерозиготными диплоидными ядрами и т. д.

Жизненный цикл грибов

Дж. Рэйпер (Raper) выделил 7 жизненных циклов у грибов.

1. **Бесполой** цикл характерен для несовершенных, или метаспоровых, грибов, которые утратили половую стадию, например грибов родов *Fusarium*, *Cladosporium*, *Verticillium*. У них нет мейоза в жизненном цикле, а присутствует только митоз. Поэтому рекомбинации происходят в парасексуальном цикле.

2. **Гаплоидный** цикл встречается у зигомицетов, вегетативный мицелий которых представляет собой мультикарионом с гаплоидными ядрами. В таком многоядерном мицелии без клеточных перегородок ядра делятся митотически по мере удлинения гиф. У гетероталлических видов, например *Phycomyces blakesleeana*, для образования диплоидной зигоспоры необходимо слияние кончиков гиф (гаметангиев) противоположных типов спаривания (+ и -). После непродолжительного периода покоя зигоспора прорастает в спорангий, где происходит мейоз, сопровождающийся многочисленными митозами, в результате чего в спорангии образуются многочисленные гаплоидные споры, которые дают начало многоядерному гаплоидному мицелию (рис. 16).

3. **Гаплоидный с ограниченным дикарионом** жизненный цикл широко встречается среди эуаскомицетов — родов *Emmericella*, *Neurospora*, *Sordaria*, *Podospora*, *Ascobolus* и др. Большинство генетически изучаемых видов грибов принадлежит аскомицетам с данным жизненным циклом, характеризующимся продолжительной гаплоидной фазой и ограниченной во времени дикариотической фазой. Вегетативный мицелий этих грибов представлен чаще всего мультикарионом с гаплоидными ядрами, а дикариотическая фаза — аскогенными гифами (рис. 17). Мейоз следует сразу же после кариогамии (слияния ядер). В половом цикле у многих эуаскомице-

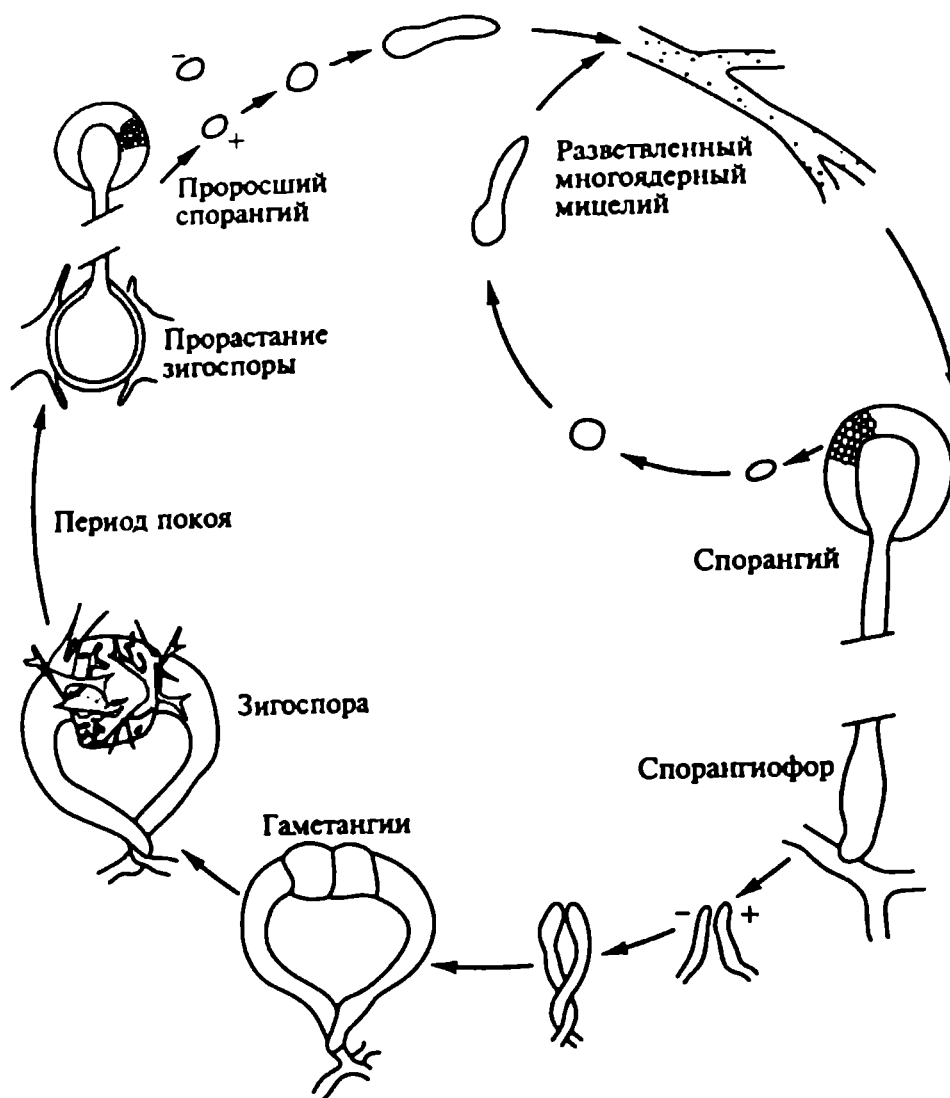


Рис. 16. Гаплоидный жизненный цикл на примере *Phycomyces blakesleeenanus*

тов дифференцированные мужской (антеридий) и женский (аскогон с трихогиной) гаметангии сливаются цитоплазмами без слияния гаплоидных ядер, т.е. образуется дикарион. У *Neurospora crassa* спермациями служат одноядерные микроконидии, имеющие оранжевую окраску и обильно образующиеся во влажных теплых условиях. Из аскогона вырастают аскогенные гифы, ядра дикариона в которых синхронно делятся (рис. 17). На аскогенных гифах по способу крючка развиваются сумки: конечная клетка аскогенной гифы загибается крючком, ядра дикариона располагаются в месте перегиба и одновременно делятся. Пара ядер противоположного пола остается в месте перегиба, а ядра другой пары мигрируют по одному в апикальную и базальную клетки, после чего образуются две перегородки, отделяющие одноядерные конечную и базальную клетки. Далее эти клетки сливаются и восстанавливается дикарион. Средняя же двухъядерная клетка крюч-

ка развивается в сумку. В сумке ядра дикариона сливаются, после чего следует мейоз с последующим митозом, что и приводит к формированию восьми эндогенных аскоспор в сумке.

Среди данной группы грибов встречаются как гомоталлические, так и гетероталлические виды, причем гетероталлизм биполярный (см. гл. 5). У гомоталлического (самофертильного) вида *Aspergillus nidulans* аскоспора прорастает в многоядерный гаплоидный мицелий, дающий обильное образование одноядерных конидий на конидиеносцах: из кончиков многоядерного конидиеносца прорастают одноядерные стеригмы, дающие начало вторичным стеригмам, отпочковывающим цепочки одноядерных конидий. Если у представителей рода *Neurospora* вегетативный мицелий представ-

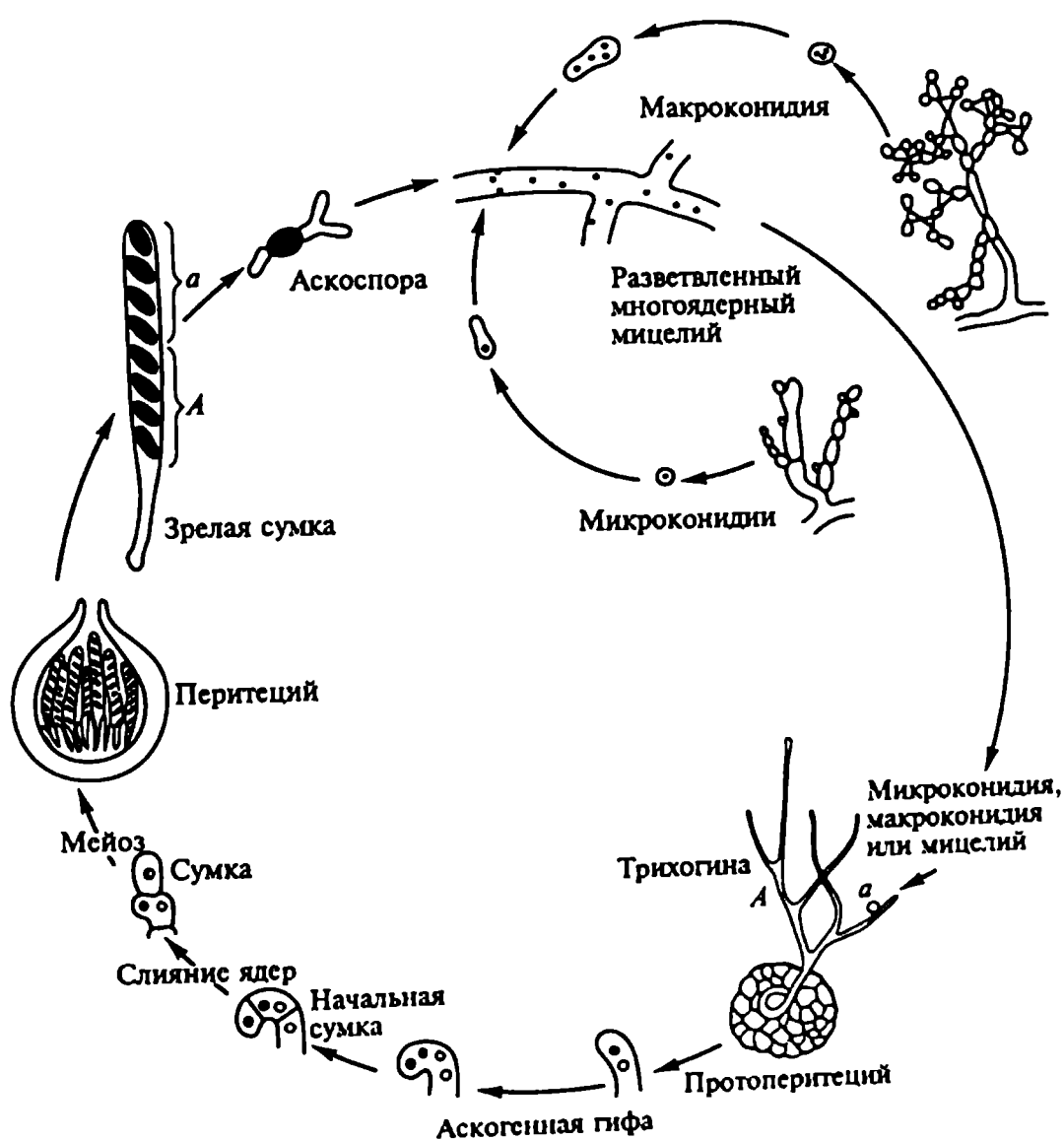


Рис. 17. Гаплоидный жизненный цикл с ограниченным дикарионом на примере *Neurospora crassa*

лен мультикардионом с гаплоидными ядрами, то у грибов рода *Venturia* клетки мицелия одно- или двухъядерные. Большинство пиреномицетов формируют микро- и макроконидии. Микроконидии *Podospora anserina* служат одновременно мужскими гаметами. У большинства эуаскомицетов образуются сумки (тетрады или октады аскоспор) с упорядоченным расположением в них аскоспор, однако встречаются виды с неупорядоченными тетрадами (октадами) спор, как, например, у *Ascobolus immersus*.

4. **Гапло-дикариотический** цикл характерен для базидиомицетов — гимено- и гастеромицетов, ржавчинных грибов. Среди них встречаются как гомоталлические, так и гетероталлические виды. Продукты мейоза — базидиоспоры — образуются экзогенно на

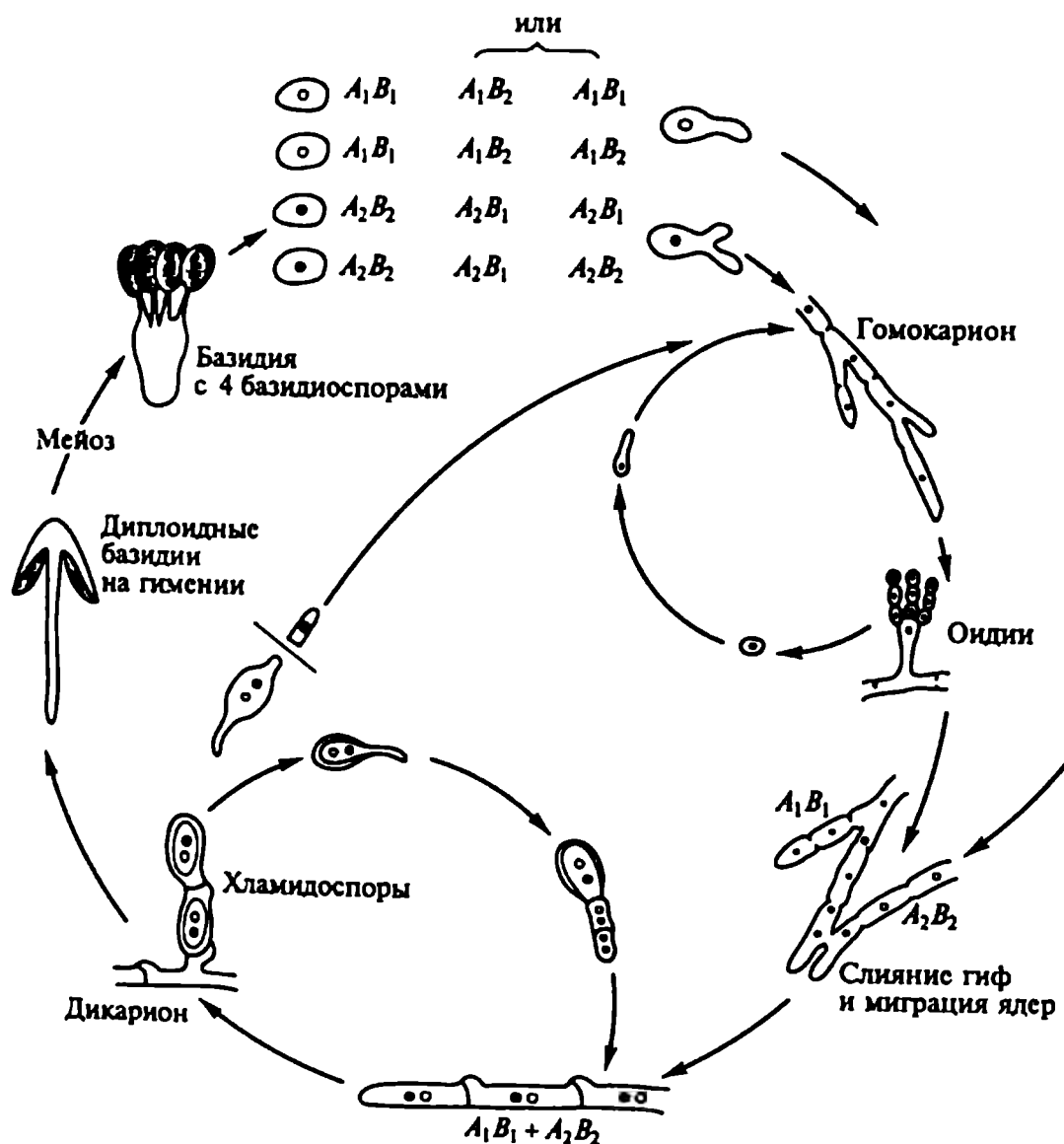


Рис. 18. Гапло-дикариотический жизненный цикл на примере *Coprinus lagopus*

специальных клетках — базидиях. Мейоз происходит в базидиях и дает начало четырем наружным гаплоидным базидиоспорам, вырастающим на стеригмах. Дикариотическая фаза продолжительная и у многих видов характеризуется образованием пряжек на мицелии. Формирование дикариотического мицелия происходит при слиянии мицелиев противоположного типа спаривания, что характерно для гетероталлических видов (рис. 18). Гаплоидная гомокариотическая фаза может также быть продолжительной и функционировать как гаплоидный мицелий. Пряжка гомологична крючку аскогенной гифы. Дикариотическая фаза заканчивается слиянием ядер в базидии с образованием диплоидного ядра, которое сразу же подвергается мейозу.

Среди гименомицетов встречается как биполярный, так и тетраполярный гетероталлизм, выражающийся в генетических различиях по типам спаривания, как, например, у представленного на рис. 18 *Coprinus lagopus*. Базидиоспоры прорастают в разветвленный септированный мицелий с одно-, реже двухъядерными клетками (гомокариотический мицелий), который продуцирует одноядерные клетки — оидии. Далее гомокарионы, совместимые по половым факторам, способны сливаться, формируя дикариотический мицелий с пряжками. На таком мицелии могут формироваться дикариотические хламидоспоры. Мейоз, происходящий в базидии, приводит к образованию четырех гаплоидных базидиоспор противоположных типов спаривания, прорастающих гомокариотическим мицелием.

5. Дикариотический цикл характерен для очень ограниченного числа грибов, а именно, головневых грибов (*Ustilaginales*). Дикариотический мицелий распространяется по межклетникам тканей зараженных растений. Базидия вырастает из покоящейся клетки — диплоидной телиоспоры. Плодовых тел не образуется. Морфогенез у этой группы грибов несколько упрощен, так как они являются паразитами растений. Диплоидная телиоспора прорастает четырехклеточной, реже одноклеточной базидией, где и происходит мейоз и образуются гаплоидные базидиоспоры (рис. 19). У возбудителя пузырчатой головни кукурузы, гриба *Ustilago maydis* базидиоспоры прорастают немедленно путем почкования в одноядерные споридии, способные расти на искусственной питательной среде. Только споридии, имеющие различные аллели по обоим локусам спаривания (как при тетраполярном гетероталлизме), способны сливаться и формировать патогенный дикарион. Дикариотический мицелий развивается в растении-хозяине.

6. Гапло-диплоидный цикл характерен для водорослей и грибов, имеющих изоморфную смену генераций, например бластокладиевых из хитридиомицетов (*Allomyces*). Диплоидный спорофит образует зооспоры и мейоспорангии (цисты). Бесполое размножение осуществляется подвижными зооспорами со жгутиками.

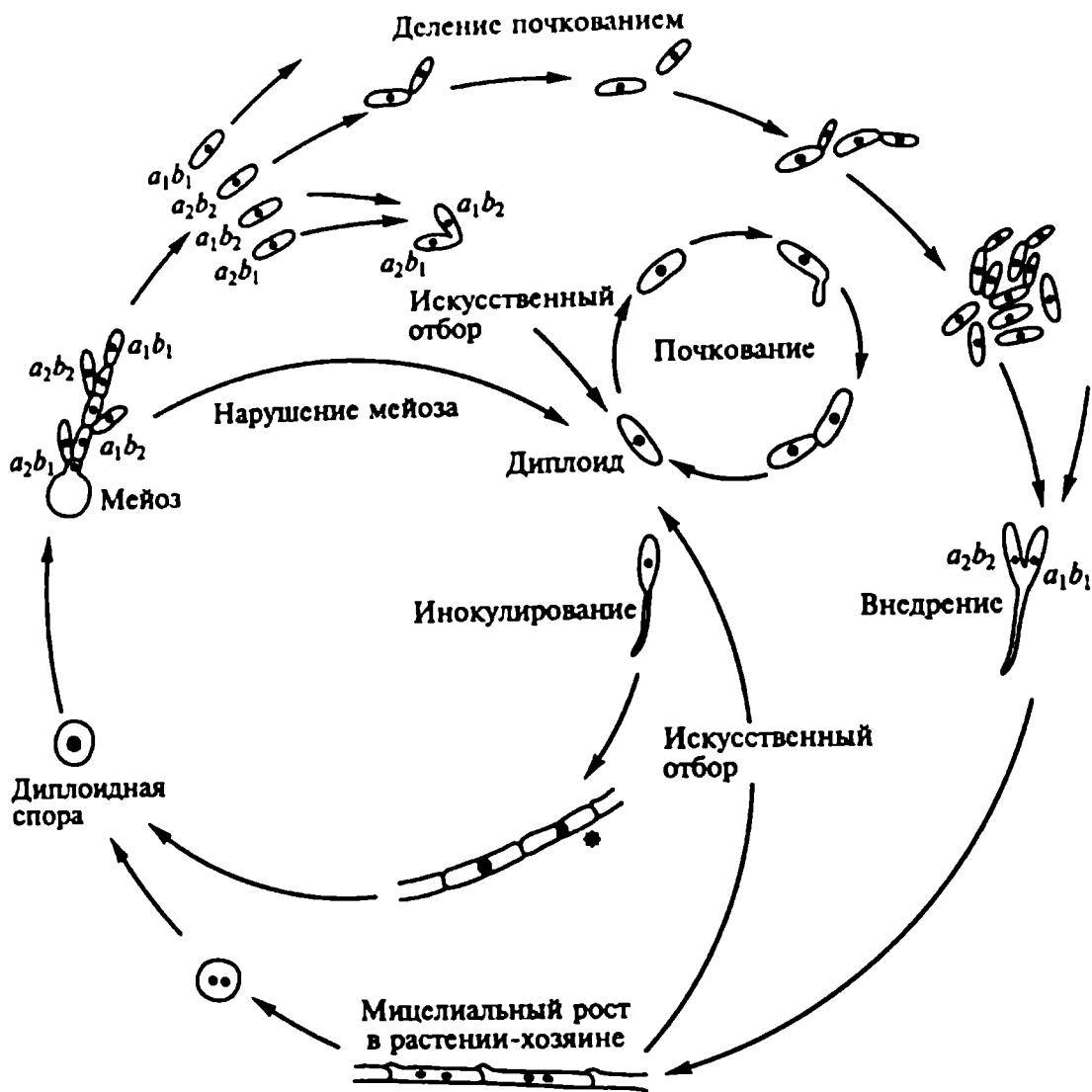


Рис. 19. Дикариотический жизненный цикл на примере *Ustilago maydis*

дающими такие же диплоидные спорофиты. Мейоспоры прорастают с редукционным делением, и выходящие из них гаплоидные зооспоры прорастают в гаплоидные гаметофиты с гаметангиями. Гаметы обычно мельче зооспор. Из зиготы после копуляции гамет снова вырастает спорофит. Гаметангии могут быть дифференцированы.

7. Диплоидный цикл — ядра зиготы претерпевают митотические деления и вегетативный таллом диплоидный, характерен для *Saccharomyces cerevisiae* и других сахаромецетных дрожжей, а также для оомицетов, например *Phytophthora infestans*. У данной группы грибов преобладает диплоидная стадия, как, например, у дрожжей, почкующиеся клетки которых на богатой углеводами среде являются диплоидными. При истощении запасов углеводов в питательной среде в клетках дрожжей происходит мейоз диплоидных ядер, в результате чего образуются сумки с четырьмя

эндогенными гаплоидными аскоспорами (рис. 20). Аскоспоры дают начало гаплоидным штаммам, которые также способны почковаться, но чаще они сливаются с образованием диплоидных клеток. Диплоидные клетки образуются в результате слияния гаплоидных клеток противоположных типов спаривания a и α (биполярный гетероталлизм); мейоз происходит в сумке с образованием 4 гаплоидных аскоспор противоположных типов спаривания (по две споры a и α).

У фитофторы мицелий диплоидный, гриб гетероталличный, т.е. требует слияния особей, различающихся по типам спаривания. После того как гаметангии объединяются (антеридиальная гифа присоединяется к оогонию), происходит кариогамия ядер и образуются диплоидные ооспоры, прорастающие диплоидным мицелием. Половой процесс у некоторых видов фитофторы (например, *Phytophthora infestans*) в природе происходит крайне редко, и гриб размножается диплоидными зооспорами, образующимися в спорангиях.

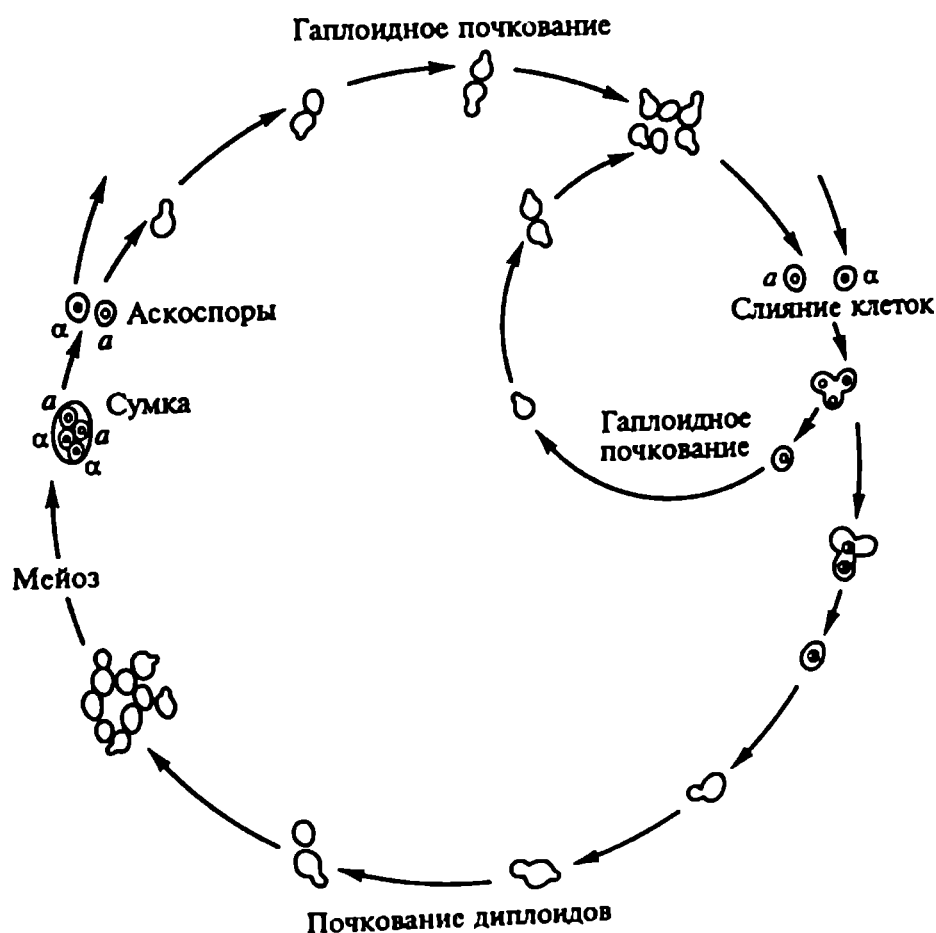


Рис. 20. Диплоидный жизненный цикл на примере *Saccharomyces cerevisiae*

Гетерокариоз

Явление многоядерности (мультикариотичности) клеток у грибов впервые изучил Х. Хансен в 1932 г. на возбудителе серых гнилей *Botrytis cinerea*. Гетерокариоз — это ассоциация двух и более генетически разнородных ядер в одной клетке.

Гетерокариотическое состояние ядер может возникнуть вследствие следующих основных процессов:

- мутаций исходных ядер первоначального гомокариона (генетически гомогенного мицелия); обнаружить подобное явление можно у монокариотичных грибов путем отрезания кончиков гиф и их изоляцией;

- слияния монокариотических мицелиев, как, например, у базидиальных грибов; слияние гомокарионов, различающихся типами спаривания, приводит к формированию дикариона (гетерокариона);

- анастомозов между гифами генетически разнородных мицелиев без слияния ядер, как, например, у фитопатогенных грибов *Pyricularia oryzae*, *Rhizoctonia solani* и др.; однако слияние разнородных мицелиев у грибов контролируется генами вегетативной несовместимости (см. гл. 5).

Р. Пухалла выделил два основных типа гетерокариоза:

- *Neurospora*, при котором клетки мультикариотичны и происходит свободная миграция ядер в клетках и между ними;

- Verticillium*, при котором клетки вегетативного мицелия в норме монокариотичны и ядра не мигрируют из клетки в клетку, в результате этого образуются мозаичные колонии.

Адаптационные преимущества гетерокариоза для грибов очевидны. Гетерокариоз обеспечивает гаплоидным организмам те же преимущества, которыми обладают гетерозиготные диплоиды, а именно: рецессивные мутации скрыты у диплоидов и маскируются доминантными аллелями. Однако рецессивный фенотип при гетерокариозе может случайно выщепляться в результате митотических делений, что можно наблюдать как сектора в культуре данного гриба. Такие сектора на фоне вегетативно растущих колоний могут различаться по окраске, скорости роста и другим морфологическим признакам, и они будут свидетельством вариабельности данного организма.

Гетерокариотическое состояние у многих грибов нестабильно. Его стабильность зависит прежде всего от способа размножения гриба. Так, у *Rhizoctonia* наблюдали стабильное состояние гетерокариотичности, а именно, все природные штаммы были гетерокариотичными. У грибов, интенсивно размножающихся одноядерными спорами бесполого происхождения, наблюдается быстрый распад гетерокарионов на исходные (родительские) гомокарионы. Например, у таких грибов, как *Aspergillus nidulans*, *Penicillium sp.*,

Pyricularia oryzae, *Neurospora crassa*, образуются одноядерные споры (микроконидии), поэтому при споровом рассеве происходит моментальный распад гетерокарионов. У грибов родов *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Botrytis* образуются многоядерные конидии, поэтому гетерокарионы будут более стабильными, а при споровых рассевах получают три типа колоний, как гетерокариотические, так и гомокариотические, соответствующие исходным родительским гомокарионам. Расщепление, или распад, гетерокарионов — это случайные события, а соотношение ядер одного из трех типов (гомокариотических и гетерокариотических) в гетерокарионе при каждом последующем рассеве конидий можно рассчитать по формулам:

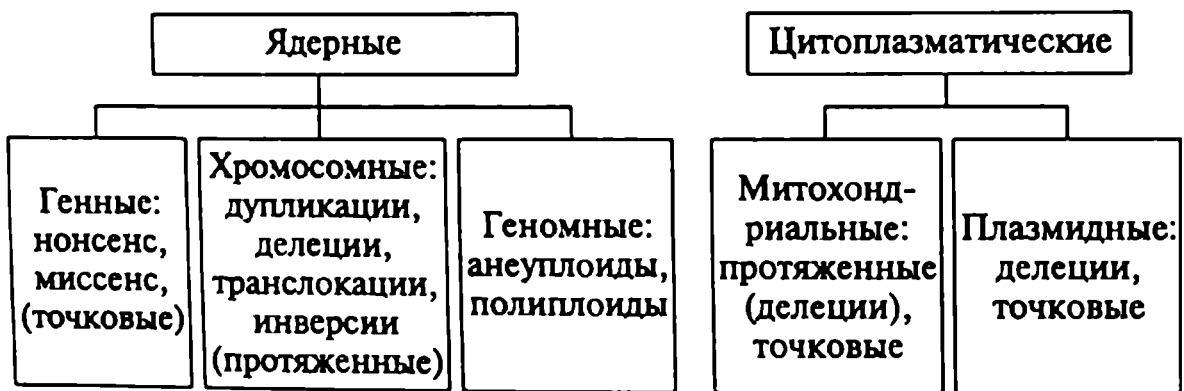
$$p = \frac{r(1-r) + a(n-2n)}{n}; \quad (1-p) = \frac{r(1-n) + b(n-2r)}{n(1-r)},$$

где p — доля ядер одного типа (гомокариона-1); $(1-p)$ — доля ядер другого типа (от гомокариона-2); r — доля гетерокариотических конидий; a , b — доля гомокариотических конидий двух типов a и b ; n — среднее число ядер в конидиях.

Типы мутаций и факторы, их индуцирующие. Специфика отбора мутантов у грибов

Генетика грибов получила свое развитие благодаря индуцированию и изучению мутаций по многим генам, как цитоплазматическим, так и ядерным. Без мутаций невозможно было бы идентифицировать те или иные гены, не говоря уже об изучении их функций. Мутации могут возникать спонтанно в популяции клеток, хотя и с низкой частотой, и могут быть индуцированы УФ-излучением, рентгеновскими лучами, а также целым рядом химических мутагенов. Современная молекулярная биология предлагает новые подходы и методы получения и изучения мутаций: направленный (*site-directed mutagenesis*) и инсерционный (*REMI = restriction enzyme mediated insertions*) мутагенез.

Мутации можно классифицировать по месту возникновения:



Генные мутации затрагивают какой-либо отдельный ген. *Хромосомные мутации* могут затрагивать крупные участки хромосом или структуру хромосом.

Генные мутации по фенотипическим проявлениям делят следующим образом (рис. 21).

Миссенс (missence) — мутации, при которых происходит превращение одного значимого кодона в другой, что затрагивает структуру мРНК и в дальнейшем выразится в изменении аминокислотной (ак) последовательности. Миссенс-мутации приводят к ак-заменам и соответственно утрате белком его функции или изменению активности белка; эти мутации могут ревертировать благодаря супрессорным мутациям, вызывающим ошибочное считывание мутантного кодона.

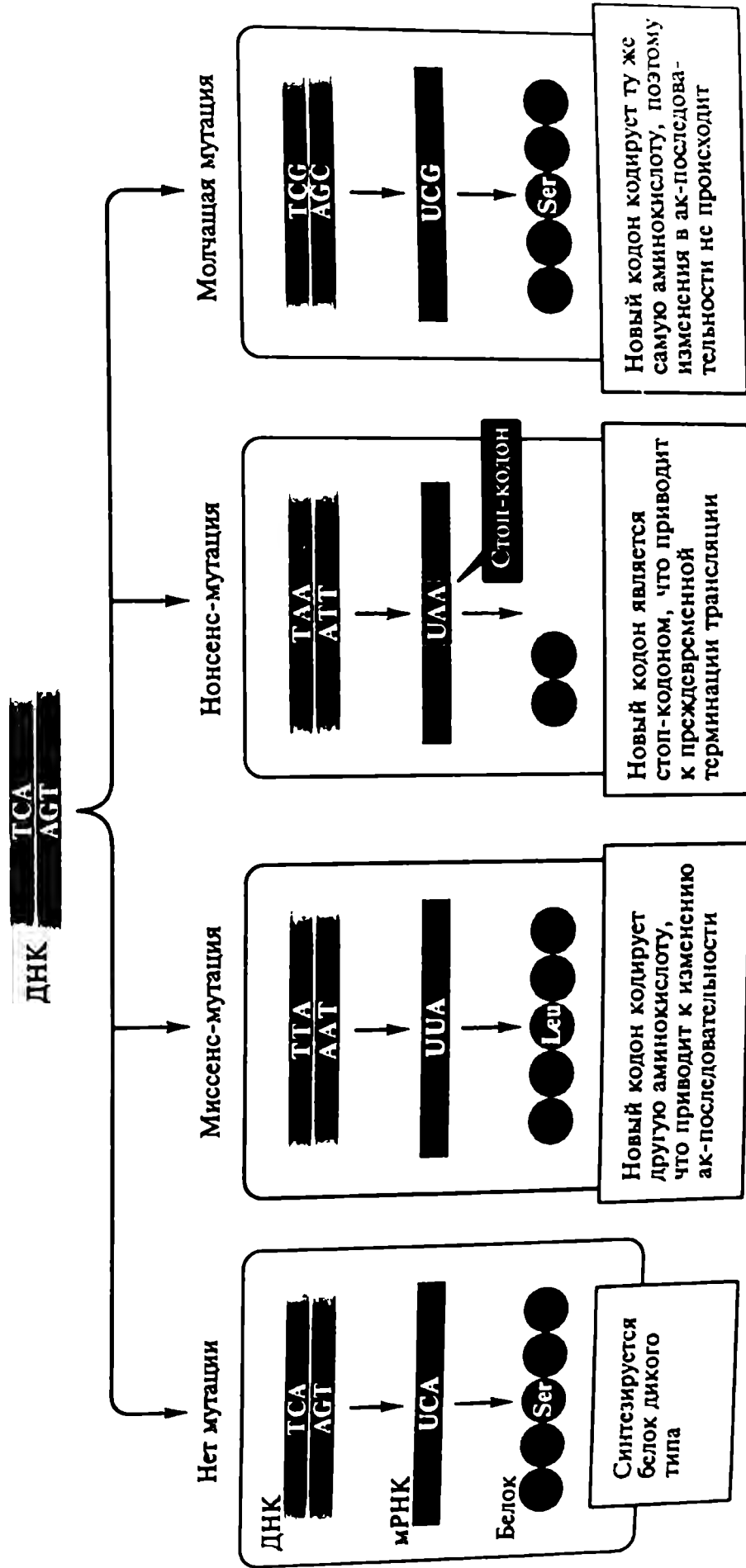


Рис. 21. Типы генных мутаций.

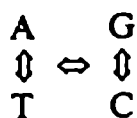
Замены нуклеотидов могут вызвать: миссенс-мутации, нонсенс-мутации, молчащие мутации

Нонсенс (nonsense) — мутации, при которых происходит замена генетически значимого кодона (*sense codon*) в *nonsense-кодон*, который терминирует трансляцию в месте этой мутации.

Молчащие мутации — это *миссенс-мутации*, которые изменяют аминокислотную последовательность белка, но не изменяют его функцию.

Точковые мутации могут быть следствием изменения пары нуклеотидов ДНК.

1. Наиболее простой тип генных мутаций — *замена нуклеотидов (base substitution)*. Замены бывают двух типов: *транзиции (transition)* (пуриновый нуклеотид заменяется на пуриновый или пиримидиновый — на пиримидиновый) и *трансверсии (transversion)* — пуриновый нуклеотид замещается пиримидином и наоборот:



2. *Инсерции (insertion)* и *делеции (deletion)* составляют другой обширный класс генных мутаций, связанных с добавлением или удалением одного и более нуклеотидных пар, что всегда сопровождается *сдвигом рамки считывания (frameshift mutation)*. Смещение рамки считывания будет менять всю транслируемую аминокислотную последовательность, что в конечном счете приведет к губительному фенотипическому проявлению. Подобные мутации могут происходить, например, при нарушении сплайсинга (вырезания интронов). Однако инсерции и делеции в три нуклеотидные пары не будут менять рамку считывания, поэтому фенотипические проявления таких мутаций могут быть не столь губительны для организма.

3. *Супрессорные мутации* — это мутации, маскирующие или подавляющие эффект действия других мутаций. Этот тип мутаций не следует смешивать с *реверсными*, или *обратными (reverse)*, при которых мутировавший участок (сайт) восстанавливает свою оригинальную последовательность дикого типа. Супрессорные мутации затрагивают другой сайт, отличный от места изначальной мутации. Таким образом, организм с супрессорной мутацией будет двойным мутантом, демонстрирующим фенотип дикого типа.

Различают два класса супрессоров: *внутригенные* и *межгенные*. *Внутригенные супрессорные (intragenic suppressor) мутации* затрагивают тот же самый ген, что и прямые мутации, нарушившие функцию этого гена. Например, внутригенные супрессоры могут подавить мутацию смещения рамки считывания: потеря одного нуклеотида (делеция) может компенсироваться вставкой недостающего нуклеотида в результате супрессорной

мутации. Внутригенный супрессор может произвести компенсирующие изменения во вторичной структуре белковой молекулы, измененной в результате миссенс-мутации; супрессор при этом восстановит изначальную вторичную структуру белковой молекулы (рис. 22).

Межгенные супрессорные (intergenic suppressor) мутации происходят в других генах, а не в тех, по которым произошла изначальная мутация. Подобные супрессоры могут действовать, изменяя путь трансляции мРНК. Например, произошла мутация, сопровождаемая заменой внутреннего кодона, отвечающего какой-то аминокислоте, в терминирующий (стоп) кодон, что неизбежно приведет к преждевременной терминации трансляции. Примером таких стоп-кодонов могут служить превращения лизинового кодона AAA в UAA или глутаминового кодона CAG в UAG. Однако если в результате второй (последующей) мутации произойдет изменение соответствующего основания в антикодоне тРНК, то терминация транскрипции может быть предотвращена, или супрессирована, в результате чего будет транслироваться полноразмерный, хотя и измененный белок (рис. 23). Итак, ошибки трансляции могут компенсировать последствия нарушений кодирующей последовательности. Мутационные изменения в антикодоне тРНК — это наиболее распространенный механизм супрессии. Мутации в генах тРНК могут также супрессировать (подавлять) миссенс-мутации и мутации смещения рамок считывания.

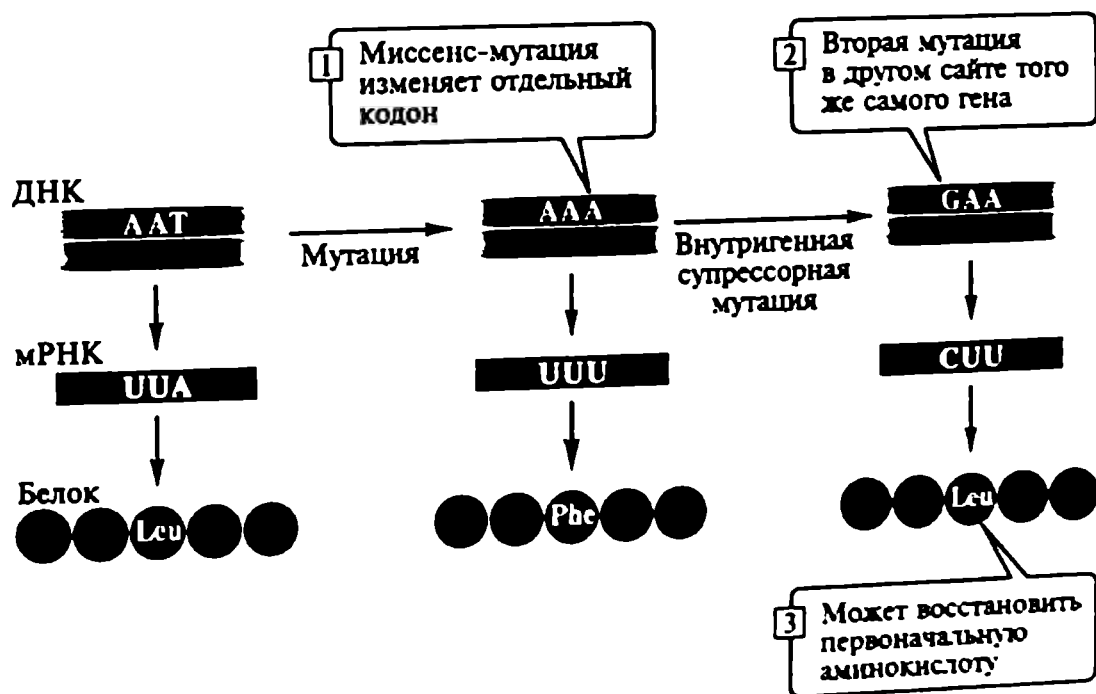


Рис. 22. Внутригенные супрессорные мутации

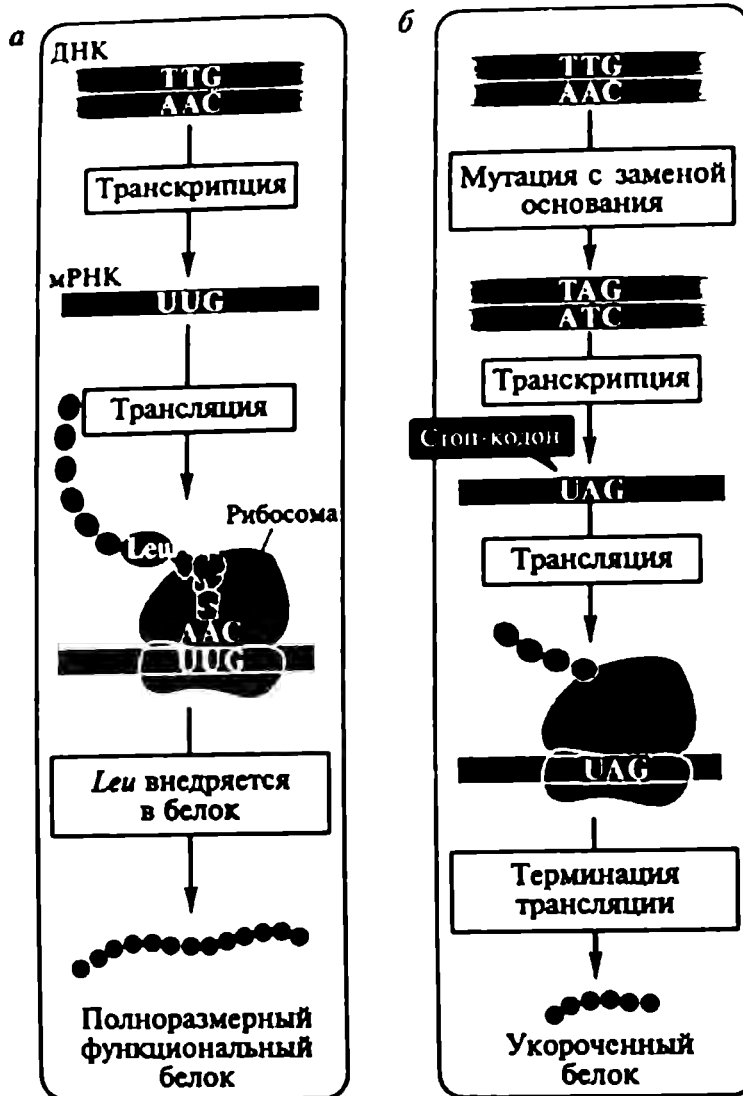
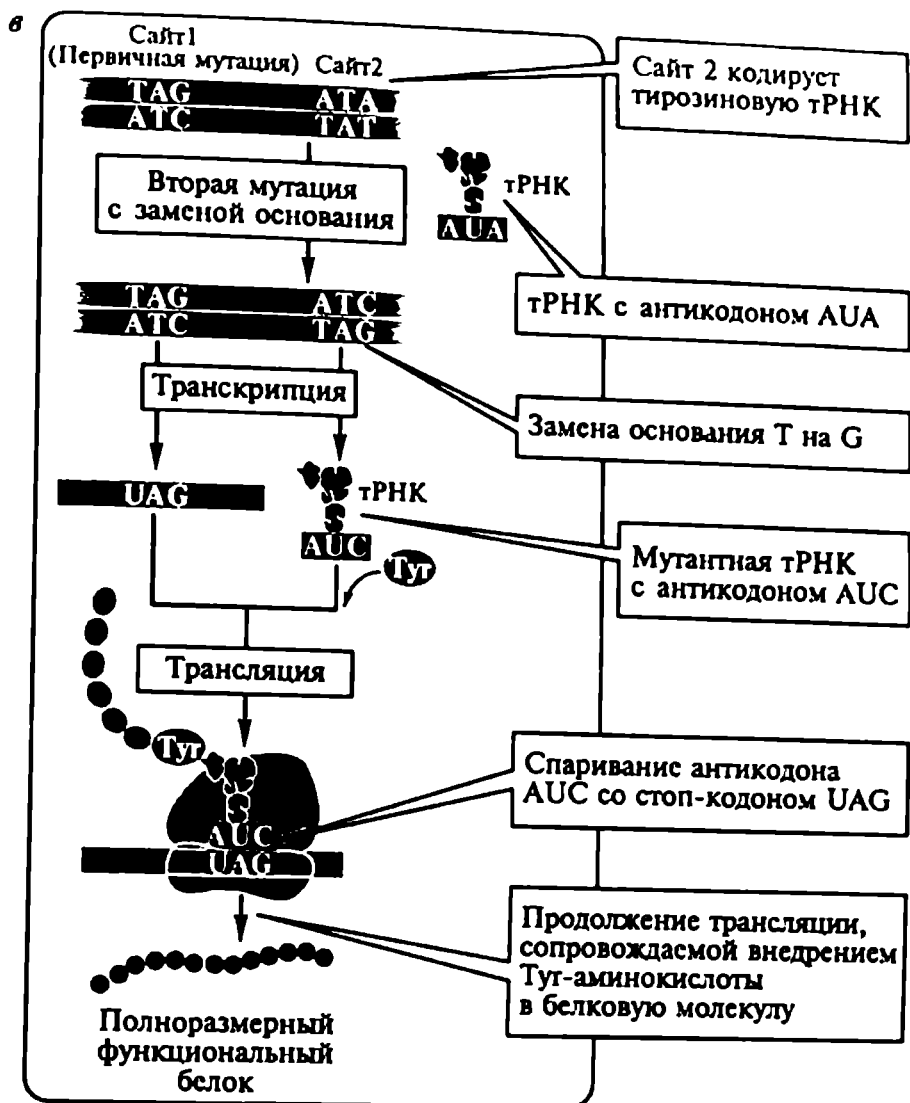


Рис. 23. Межгенные су-

а — последовательность дикого типа производит полноразмерный белок; *б* — замещается синтезом укороченной неполноценной белковой молекулы; *в* — замена антикодонтирозиновой тРНК так, что тирозиновая тРНК может спариваться со последовательностью, и трансляция продолжается. Тирозин замещает лизинный

Межгенные супрессоры являются примером *генетического контроля терминации трансляции*. Недавно в лаборатории С. Г. Инге-Вечтомова в Санкт-Петербургском университете был продемонстрирован *эпигенетический контроль* терминации трансляции у дрожжей, связанный с прионами. Прион — *PSI*-белок, являющийся продуктом гена *su35* (гена-супрессора), участвует в терминации трансляции. Рecessивные мутации по этому гену температурочувствительны и влекут за собой считывание нонсенс-кодонов. N-терминальный пептид *PSI*-белка отвечает за «прионизацию», связанную с олигомеризацией амелоидных образований в клетках дрожжей, которые отщепляют «молекулярные семена»,



прессорные мутации:

на нуклеотида в одном сайте гена приводит к образованию стоп-кодона, что сопровождается мутацией в сайте другого гена, который в данном случае кодирует тРНК, изменяя стоп-кодоном изначальной мутации, позволяя тирозину встраиваться в белковую аминокислотный остаток, имевшийся в первоначальной белковой молекуле

попадающие при делении в дочерние клетки. Любой прион способен супрессировать нонсенс-мутации, а также вызывать супрессию мутаций сдвигов рамок считывания (*frameshifts*). Почему эти супрессии скоррелированы, пока не ясно. Таким образом, считывание стоп-кодонов за счет прионного превращения белков можно рассматривать как один из возможных путей эпигенетической регуляции трансляции.

Среди *протяженных мутаций* различают делеции, дупликации, транслокации и инверсии. Источником появления *дупликаций* и *делеций* служат неравные кроссинговеры, приводящие к добавлению протяженных участков ДНК и даже блоков генов. Неравные

кроссинговеры — это своего рода «ошибки» гомологичной рекомбинации. *Транслокации* связаны с переносом участков хромосом и происходят обычно при разрывах хромосом. *Инверсии* сопровождаются поворотом участка гена или блока генов на 180° в результате чего изменяется порядок чередования генетических элементов в пределах гена или группы сцепления. Следует заметить, что все вышеперечисленные типы протяженных мутаций могут быть индуцированы действием мобильных элементов.

Геномные мутации сопровождаются изменением числа хромосом в ядре. К ним относят полиплоидизацию и анеуплоидизацию. *Полиплоидизация* — изменение числа хромосом, кратного гаплоидному набору (например, $3n$). *Анеуплоиды* возникают при потере или добавлении отдельных хромосом ($2n + 1$, $2n - 1$). Организмы с потерей пары гомологичных хромосом ($2n - 2$) относят к *нуллисомам*.

Цитоплазматические мутации

Наследственный цитоплазматический материал у грибов сосредоточен в основном в митохондриях. Митохондрии содержат небольшие кольцевые молекулы ДНК. Однако гены, кодирующие структурные белки митохондрий, локализованы в ядре. В митохондриях грибов имеется стандартный набор генов дыхательной цепи, генов рибосомальных (рРНК) и транспортных (тРНК) РНК, а также гены АТФаз. Показано, что у дрожжей в мт-геноме имеется несколько промоторных участков. При делении митохондрий ДНК способна к саморепликации независимо от ядерного генома. Репликация кольцевых ДНК митохондрий происходит по принципу «катящегося кольца», отличающемуся от репликации ядерной ДНК (см. рис. 15).

Цитоплазматическая наследственность у грибов может быть связана также с наличием плазмид, автономно реплицирующихся в цитоплазме. Плазмидная ДНК может нести факторы устойчивости к лекарственным веществам, локусы токсинообразования (*kalilo* — у *N. crassa*, *killer* — у *Kluyveromyces lactis*). Плазмиды могут рекомбинировать как между собой, так и с ДНК хромосом. Вирусные ДНК, передающиеся от родителя к потомкам через цитоплазму, также могут контролировать некоторые признаки, например гиповирулентность штаммов *Cryphonectria parasitica*. Таким образом, *внехромосомная цитоплазматическая наследственность* у грибов может быть связана с ДНК митохондрий, плазмид, часть которых используются при клонировании ядерных генов.

Первые митохондриальные мутации (ρ^- и ρ^0) получены французским генетиком Б. Эфрусси на дрожжах еще в 40-е годы XX в.

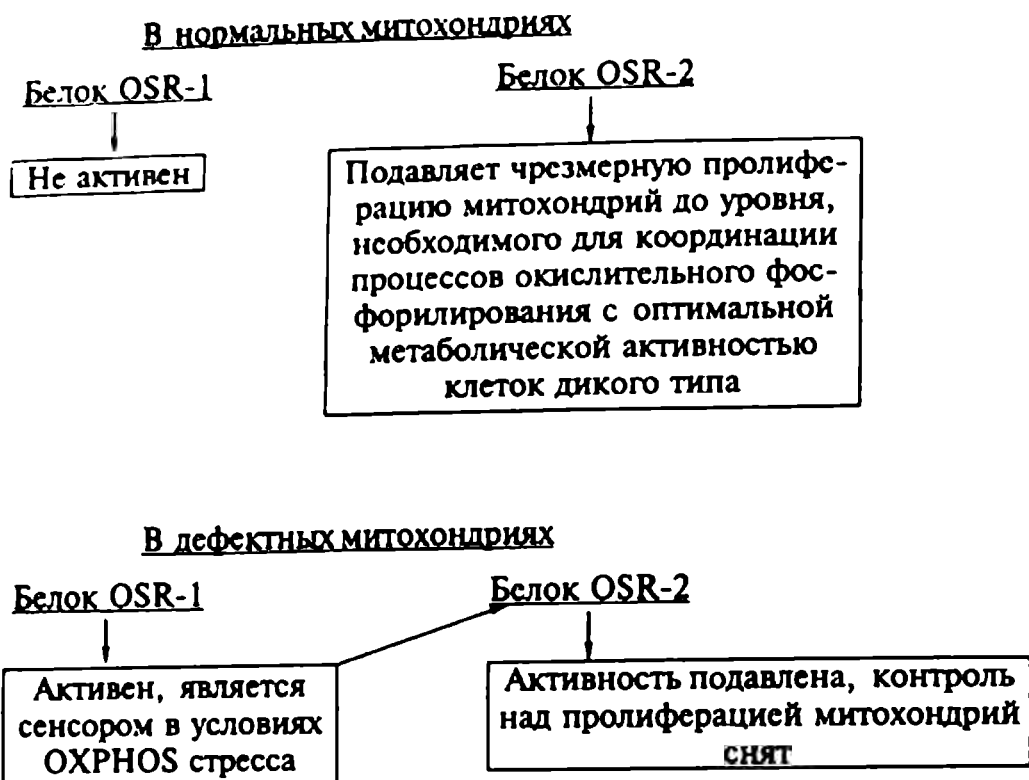
Эти *petite*-мутации были связаны с нарушением функций дыхательной цепи и характеризовались замедленным (карликовым) ростом колоний. Мутации p^- — это делеции участка мтДНК, p^0 — полное отсутствие митохондриальной ДНК. *Petite*-мутанты не способны осуществлять аэробное дыхание, и источником энергии в таких клетках служит анаэробное дыхание (гликолиз), которое значительно менее эффективно, чем аэробное дыхание. Это и выражается в замедленном росте колоний. Делеции нарушают участки мтДНК, кодирующие ферменты дыхательной цепи (аэробного дыхания); поэтому клетки не способны производить достаточное количество АТФ, что и приводит к ингибированию их роста.

У мицелиальных грибов также были обнаружены *респирааторные* мутации (связанные с нарушениями функции дыхательной цепи митохондрий), имеющие материнское цитоплазматическое наследование, например *roky*-мутации *Neurospora crassa*, выделенные Дж. Митчел.

Карликовые нелетальные мутации могут быть связаны как с делециями участков митохондриальной ДНК, так и с точковыми мутациями. *Рокы*-фенотип выражается в замедленном росте гиф и замедленном прорастании спор полового и бесполого происхождения, что связано с ненормальным количеством цитохромов — белковых компонентов электрон-транспортной цепи митохондрий, играющих интегрированную роль в производстве АТФ. У *roky*-мутантов есть цитохром *c*, но у них отсутствуют цитохромы *a* и *b* и, следовательно, нарушена функция окислительного фосфорилирования (OXPHOS). Эти мутации называют также супрессивными, потому что в клетках с нарушениями OXPHOS-функций дефектные митохондрии индуцируются к делению в три раза чаще, чем нормальные митохондрии. В данном явлении супрессивности участвуют ядерные гены *osr-1* и *osr-2* (*OXPHOS stress response genes*). Полагают, что эти гены экспрессируются постоянно и их белки транспортируются в митохондрии.

Экспортируемые генопродукты OSR-1 и OSR-2 в митохондриях действуют по-разному: в нормальных митохондриях, у которых не нарушена функция OXPHOS и которые делятся реже, белок OSR-1 неактивен, а белок OSR-2 подавляет пролиферацию митохондрий. В дефектных митохондриях, наоборот, белок OSR-1 активизируется и инактивирует белок OSR-2, чем и снимает его действие, направленное на подавление чрезмерного деления митохондрий. Поэтому дефектные по дыханию митохондрии начинают чаще делиться.

Ниже представлена схема супрессивности дефектов митохондриальной ДНК с помощью продуктов ядерных генов у *N. crassa*:

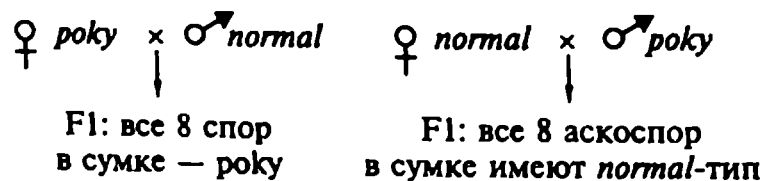


Физиологически явление повышенного накопления дефектных митохондрий в клетках нейроспоры объяснимо, так как необходимо компенсировать недостаточность функции OXPHOS-системы.

Мутации устойчивости к антибиотикам — в основном это точковые мутации в митохондриальных генах дыхательной цепи.

Отличить ядерные мутации от цитоплазматических можно прежде всего по характеру их наследования. Существуют следующие критерии, свидетельствующие о внеядерном экстрахромосомном наследовании.

1. Различия при реципрокных скрещиваниях. При скрещивании *roky*-мутантов *N.crassa*, характеризующихся медленно растущими колониями, с нормальными штаммами в потомстве аскоспор в сумке всегда происходило наследование материнского фенотипа (по перитециальному родителю) (M. Mitchel, 1952):



Признак передавался по материнской линии с материнской цитоплазмой. Однако этот тест пригоден не для всех грибов, а только для тех, у которых присутствует половой диморфизм (*Neurospora*, *Podospora*). Наследование синдрома старения у *P. anserina* также происходит по материнской линии и связано с мтДНК.

2. **Неменделевское расщепление признаков.** Проводили скрещивания между *rho*-мутантами, дефектными по дыханию и характеризующимися замедленным ростом, и нормальными клетками дрожжей:

Дрожжи a	×	α	→ F1: 20	22	по типу спаривания			
<i>rho</i> ⁻		<i>rho</i> ⁺	0	100	(4	0	или 0	4)
Карликовый		Нормальный			по признаку <i>rho</i>			
фенотип		фенотип			Соотношение			
					в тетрадах			

В этой схеме **a** и **α** — это факторы типов спаривания, имеют ядерное наследование и демонстрируют обычную сегрегацию мейотических продуктов с ядерным наследованием признаков — 1 : 1, т. е. налицо менделевское расщепление в тетраде. Карликовый рост колоний — это цитоплазматический признак, и в этом случае потомству передается только один из родительских фенотипов.

3. **Тест на гетерокарион.** У *Aspergillus nidulans* формируем гетерокарион между двумя штаммами со следующими признаками:

aλ	+	bβ
Зеленые		Желтые
колонии		колонии

Допустим, что признаки λ и β отвечают за некий цитоплазматический фенотип, **a** и **β** — ядерные признаки, отвечающие за окраску конидий (зеленые и желтые).

Если признаки λ и β имеют цитоплазматическое наследование, то в моноконидиальном потомстве при расщеплении гетерокариона будут получаться четыре фенотипа:

aλ	bλ
aβ	bβ

т. е. цитоплазматические признаки независимо комбинируются с обоими ядерными признаками.

Если признаки λ и β — ядерные, то потомство будет представлено только двумя фенотипами:

aλ и **bβ**.

Таким образом, тест на гетерокарион предполагает конструирование гетерокариона между двумя штаммами, отличающимися по какому-либо хромосомному маркеру и изучаемому внеядерному, при этом формируется практически гетероплазмон, так как объединяются различные цитоплазмы. Далее исследуют наследование признаков в одноядерных конидиях или кончиках гиф. Удобным для анализа является вид *Aspergillus nidulans* с одноядерными конидиями.

Например, изучали наследование мутантного *red*-фенотипа у *A. nidulans* (J. Jinks et al., 1962). Этот мутантный фенотип характеризуется секретцией большого количества красноватого пигмента в среду, неспособностью формировать достаточное число перитециев и ускоренным ростом мицелия. При формировании гетерокариона (гетероплазмона)

$$w^+ red + wA non-red$$

группы изолятов, полученных из одноядерных конидий, распределились по 4 фенотипам следующим образом:

<i>w⁺ red</i>	<i>w⁺ non-red</i>	<i>wA red</i>	<i>wA non-red</i>
211	43	51	762

где *wA* — ядерный маркер, отвечающий за белую окраску конидий; *w⁺* — зеленые конидии.

Признак *red* свободно комбинировался с ядерным маркером *white* (белые конидии), хотя и с некоторым дисбалансом фенотипов в числовом выражении. Наблюдали значительное преобладание белых — нормальных *wA non-red*. Следовательно, признак *red* имеет цитоплазматическое наследование.

Дж. Джинкс и его школа в Бирмингеме в многочисленных экспериментах на *A. glaucus* с использованием теста на гетерокарион показали, что такие признаки, как вариабельность в прорастании спор, скорость роста колоний, пигментация перитециев, находятся под контролем цитоплазмы во время дифференцировки и старения культур.

4. Стойкое расщепление гомокариона, или так называемая *реплицирующаяся нестабильность*. Фенотипически проявляется в получении мозаичных колоний при каждом последующем рассеве спор дикого типа, т.е. когда отбор колоний при рассевах идет по дикому типу. Заметим, что гомокарион, по определению, должен иметь генетически однородные ядра. Реплицирующуюся нестабильность ряда мутантов можно повысить действием УФ и нитрозогуанидина.

5. Нестабильность индукции. Существуют мутагены с преимущественным влиянием на цитоплазматические мутации. К таковым принадлежат акридиновые красители, высокие температуры. Многие индуцированные акридиновыми красителями мутации связаны с нарушением функций дыхательной цепи.

Ядерные мутации

Ядерные мутации можно разделить по нескольким категориям.

По направлению изменений фенотипов различают прямые и обратные (*reverse*) ядерные мутации.

Прямые мутации сопровождаются изменением нормальных признаков.

Обратные мутации сопровождаются восстановлением дикого фенотипа, иногда могут быть результатом действия генов-супрессоров. Ген-супрессор — это аллель, который маскирует эффект мутации в другом гене, т. е. супрессорные мутации могут приводить к восстановлению у мутанта дикого фенотипа, хотя первоначально состояние самого мутантного гена не восстанавливается. Как уже говорилось выше, супрессоры бывают двух типов — непря-
генных супрессоров первичное генетическое повреждение мутантного гена не «залечивается» (исправляется), а выбирается альтернативный путь биосинтеза. Такая супрессорная мутация происходит в другом гене, отличном от того, который был поврежден прямой мутацией. *Внутригенные супрессорные мутации* сопровождаются повторным изменением генов, в которых уже произошла прямая мутация. Примером могут служить мутации по гену глутаматдегидрогеназы am^2 , am^3 , am^{19} у *Neurospora crassa*.

Обратные мутации иногда происходят с более высокой частотой, чем прямые, например, как это было отмечено для реверсий аргининовой мутации (*arg*) к дикому типу у *Schizosaccharomyces pombe*. У *N. crassa* частоты обратных мутаций под действием различных мутагенов значительно различались: реверсия локуса $ad^- \rightarrow ad^+$ происходила спонтанно с частотой $0,2 \cdot 10^{-6}$ конидий, под действием УФ — с частотой $3,5 \cdot 10^{-6}$ конидий, а под действием химического мутагена диметилсульфата частота реверсии возрастала на порядок и доходила до $8,4 \cdot 10^{-5}$. Ген *ad4* *N. crassa* контролирует активность фермента аденилсукциназы, который участвует в биосинтезе пуринов; под действием УФ было получено 23 мутанта, причем 19 были способны ревертировать к прототрофности. Сейчас мы знаем, что многие обратные мутации связаны с вырезанием и транспозициями (инсерциями и эксцизиями) мобильных элементов (транспозонов), что было ранее продемонстрировано на примере *his4* локуса *S. cerevisiae* и *ad3*-локуса *N. crassa* (см. гл. 1).

По причинам возникновения различают спонтанные и индуцированные ядерные мутации.

Под спонтанным мутационным процессом принято понимать возникновение мутаций, конкретные причины которых нам неизвестны. Неконтролируемые воздействия внешней среды, а также постоянно протекающие в самом организме процессы могут служить причиной спонтанной мутационной изменчивости. *Спонтанные* мутации могут быть следствием: а) нарушений молекулярного механизма репликации ДНК при делении ядер; б) сдвига рамки считывания (*frameshifting*) при нарушении механизма сплайсинга; в) нарушений при спаривании нуклеотидов (*mismatching*). Они могут зависеть также от внешних причин и возникать в результате геномных перестроек, связанных с действием транспозонов. На дрожжах было показано, что локусы, характеризующиеся

повышенной спонтанной мутабельностью, дефектны по процессам репарации ДНК.

Индукцированные мутации возникают в результате воздействия различных мутагенов. *Химический мутагенез* влечет за собой целую серию индуцированных мутаций. Например, аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований могут встраиваться при синтезе молекулы ДНК с образованием «ошибок». Так, 5-бром урацил может заменить тиминовое основание, а 2-аминопурин является аналогом аденина. Азотистая кислота действует на неделящиеся клетки и вызывает замещения азотистых оснований (*base pair transitions*). Нитрозогуанидин вызывает мутации в месте репликации ДНК путем метилирования и этилирования ДНК. Беномил нарушает сборку микротрубочек веретена. К *физическим мутагенам* относят температурный шок, УФ-излучение и рентгеновские лучи. Рентгеновские лучи вызывают повреждения молекул ДНК: их разрывы, делеции, перестройки. В отличие от рентгеновских лучей УФ-лучи отличаются прямым воздействием на азотистые основания ДНК, при которых образуются ковалентно замкнутые димеры пиримидиновых оснований.

По фенотипу выделяют ядерные мутации: летальные, условно летальные и с измененным фенотипом.

Летальные и условно летальные мутации, нарушающие жизнеспособность клеток, являются причиной гибели зиготы на той или иной стадии развития. У грибов изучение летальных мутаций возможно, так как их можно сохранять в гетерокариотических клетках. Летальные мутации могут быть: *рецессивными, доминантными, митотическими и цитоплазматическими*.

Рассмотрим следующий пример. Допустим, леталь изучается в гетерокарионе. Многоядерная спора дает гетерокариотическую колонию (как, например, у *Fusarium*). В потомстве конидий наблюдаются 3 типа колоний, соответствующих двум изначальным родительским гомокарионам и гетерокариону. Процент гетерокариотических колоний, получаемых при споровом рассеивании после воздействия мутагена, будет зависеть от характера летали:



Если леталь рецессивна, то процент гетерокарионов при увеличении дозы мутагена будет расти вследствие того, что преимущественно погибнут одноядерные споры. Если леталь доминантна, доля гетерокарионов при увеличении дозы мутагена будет снижаться. В случае митотической летали, когда ядро при делении клетки гибнет, процент гетерокарионов резко упадет, а в случае цитоплазматической летали процент гетерокарионов при увеличении дозы мутагена не изменится.

Доминантные летали приводят к тому, что зиготы становятся не способными к делению.

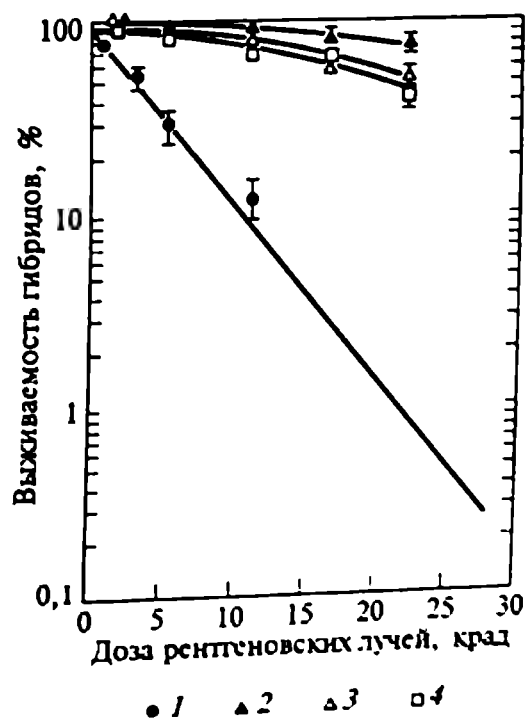
У дрожжей *S. cerevisiae* доминантный летальный эффект проявляется в зиготе ($2n$) (рис. 24). Облученные рентгеновскими лучами клетки с помощью микроманипулятора скрещивали с необлученными. Доминантные летали после облучения одного из родителей были обнаружены во всех скрещиваниях: $+ \times +$; $rad52 \times +$; $+ \times rad52$; $rad52 \times rad52$ (+ обозначает клетки дикого типа). Все кривые на рисунке свидетельствуют о снижении выживаемости гибридов, поэтому можно сделать вывод о том, что произошли доминантные летальные мутации. Доминантные летали и приводили зиготы к гибели. Однако в скрещивании $rad52 \times rad52$ обнаружена более высокая частота доминантных леталей; следовательно, у мутанта $rad52$ нарушена репарация клеток, избавляющая их от доминантных леталей. Мутант $rad52$, чувствительный к рентгеновским лучам, представляет собой мутацию по гену $rad52$. Установлена роль rad -генов (DNA repair genes) одновременно в двух процессах — репарации и мейотической рекомбинации. Мутантные аллели rad -генов вызывают дефекты мейоза, связанные с нарушениями формирования синаптонемного комплекса, синапсиса хромосом, конденсации и сегрегации хромосом.

Рис. 24. Сравнение индукции доминантных леталей у дрожжей *S. cerevisiae* при действии рентгеновских (R) лучей (по Т. Но, R. Mortimer, 1973).

Облученные клетки с помощью микроманипулятора скрещивали с необлученными:

1 — $rad52 \times rad52$; 2 — $rad52 \times +$;
3 — $+ \times rad52$; 4 — $+ \times +$.

Воздействию R-лучей подвергался родитель, указанный в скрещивании первым



Рецессивные летальные мутации. У диплоидных организмов рецессивные летальные мутации будут проявляться только у гомозигот, рецессивных по данному локусу. В случае же гаплоидных грибов подобная мутация будет летальной всегда, так как не происходит комплементации со стороны доминантного локуса дикого типа. В гетерокарионах рецессивные летали могут также маскироваться. На нейроспоре было показано, что индуцировать рецессивные летальные мутации можно под действием рентгеновских лучей, при этом многие рецессивные летали были обусловлены делециями хромосом.

Условно летальные мутации — это мутации, приводящие к летальному фенотипу при ненормальных условиях. Например, *ts*-мутации (температурочувствительные): при нормальных пермиссивных температурах образуется нормальный белок, и клетки функционируют; при повышенных температурах среды (рестриктивных) клетки погибают. Например, для гриба *Pleurotus ostreatus* температура 25 °С оптимальна для нормального роста мицелия, при 33 °С рост замедляется, а при 35 °С клетки гибнут. Таким образом, при температуре 35 °С можно отбирать температурочувствительные *ts*-мутации.

С помощью *ts*-мутаций удалось изучить генетику полового цикла у дрожжей, генетику клеточного цикла у *Aspergillus nidulans*. *Ts*-чувствительные мутанты могут иметь дефекты по РНК- и ДНК-синтезу, как, например, у *arg*-мутаций (abnormal ribosomal profile) *A. nidulans* отмечали избыток малых рибосомальных субъединиц по сравнению с большими субъединицами.

Температурочувствительные мутации дрожжей, не способные к митозу при рестриктивных температурах, могут быть связаны с нарушениями в синтезе различных макромолекул — белков, ДНК, РНК. Например, *cscs*-мутанты (cold-sensitive cell cycle mutants) не способны к почкованию при рестриктивных температурах. Мутанты *ts* могут иметь нарушения по различным этапам полового цикла. Так, мутация *spo1* у дрожжей вызывала дефект при делении тела веретена (spindle pole body).

Многие мутанты, дефектные по мейозу, имеют нарушения рекомбинационных процессов. Однако мутанты дрожжей *spo1*, *spo2*, *spo3*, не способные к мейозу, были полностью способны к рекомбинации. У *Schizosaccharomyces pombe* было выделено множество мутантов, не способных спорулировать (образовывать мейотические аскоспоры); причем среди них удалось выделить классы, различающиеся по блокированию того или иного этапа полового цикла, — от слияния клеток до нарушений в первом и втором мейотических делениях. У *Aspergillus nidulans* получили *ts*-мутанты, растущие в пермиссивных условиях при 32°, но не способные расти при рестриктивных температурах в 42°С. При этом возникали нарушения, связанные с тем, что в рестриктивных усло-

виях нормальный рост ростковой трубки, берущей начало из споры, происходил, однако деления ядер не было. Данный мутант-ным ядром.

Для других температурочувствительных мутантов *sepA-D A. nidulans* нормальный рост клеток и деление ядер сопровождались нарушениями в образовании септ (клеточных перегородок). Мутанты *sepA* имели ненормально широкие гифы, интенсивно ветвящиеся, что было связано с дефектом биосинтеза клеточных стенок и нарушением полярности клеток. Мутанты *sepD* имели внешне нормальный фенотип, но отличались от дикого типа отсутствием септ. У мутантов *sepB* происходил «арест» ядерных делений: деление ядер прекращалось после третьего митоза, в результате чего в клетках данных мутантов количество ядер равнялось 8, и ядра были несколько удлинненными.

Изолировать *ts*-мутации просто: нужно экспонировать споры при различных температурах, после чего сделать споровые рассевы, и полученные реплики инкубировать при различных температурах, а потом проводить отбор *ts*-мутаций. Условно-летальные мутации — важная для генетиков группа мутаций, так как они дают возможность работать с изменениями генома, затрагивающими важнейшие функции организма, что вызывает его гибель.

Мутации с измененным фенотипом подразделяют на морфологические, биохимические и физиологические.

Эти категории мутаций наиболее часто используются в генетике грибов, поэтому мы также отметим специфику отбора данных мутантов у грибов.

Морфологические мутации могут сопровождаться изменением макро- и микроморфологии. Эти мутации неселективны. Например, известные колониальные (*colony*) мутации *N. crassa* имеют компактный рост колоний вместо характерных длинных тяжей. *White, yellow* мутанты *Aspergillus nidulans* имеют белую и желтую окраску колоний вместо типичной зеленой. *Розовые* мутанты *Pyricularia oryzae* связаны с нарушением этапов биосинтеза меланинов. Морфологические мутанты помогли во многом изучить процесс формирования клеточных стенок у грибов, дифференцировки спорообразования (работы на *Neurospora*, проведенные в лаборатории Е.Тэйтума).

К **биохимическим мутациям** относятся **ауксотрофные** мутации, отбор которых осуществляется на селективных средах. Впервые их изучение началось на *Neurospora crassa* в лаборатории Е.Тэйтума и Дж. Бидла в Стенфордском университете в 1945 г. Ауксотрофы не могут расти на средах с минимальным содержанием питательных компонентов, необходимых для роста колоний дикого типа (прототрофов). Например, у *N. crassa* мутация по адениновому локусу *ad3* выражается дефектом определенного этапа биосинтеза

аденина и одновременной секрецией в среду пурпурного пигмента (производного предшественника аденина) в аэробных условиях. Целая серия адениновых мутантов с пурпурной пигментацией среды была выделена у дрожжей *S.cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. Иногда пищевая потребность в каком-либо веществе у мутанта может быть подавлена мутацией в другом локусе (в генесупрессоре). Такая супрессия может проявляться на уровне трансляции мутантных мРНК. *Супрессорные* мутации, как уже было сказано выше, преодолевают или «запрещают» эффект прямых мутаций. Наряду с широко распространенной метаболической супрессией, сопровождаемой выбором альтернативного метаболического пути, может происходить и трансляционная супрессия, изменяющая чтение генетического кода при трансляции мРНК.

Отбор ауксотрофных мутантов относительно прост. Обработанные мутагеном споры или конидии рассеивают на чашки Петри в необходимых разведениях, а потом делают реплики на минимальные среды, содержащие различные питательные компоненты (аминокислоты, азотистые основания и витамины). *Метод реплик* заключается в «перепечатке» колоний с агаризованной полноценной среды на две чашки Петри: одну — с минимальной средой, другую — с полноценной (чтобы отобрать мутанты). Впервые метод реплик был применен Дж.Ледербергом для бактерий: стерильный вельвет, наклеенный на пестик, равный диаметру чашки Петри, прижимают к поверхности чашки с выросшими колониями, а потом переносят на среды с различными добавками; в тех местах, где рост колоний отсутствует, можно говорить о дефектном фенотипе. Однако этот метод хорош для отбора одноядерных спор и затруднен при работе с многоядерными конидиями. Значительно ускорить процесс идентификации питательных потребностей ауксотрофных мутантов позволяет схема, предложенная Р.Холлидеем (табл. 6).

Применение данного метода позволяет определить потребности исследуемых мутантов в 36 ростовых факторах, используя при этом только 12 чашек с минимальной средой, обогащенной ростовыми факторами (по шесть ростовых факторов на чашку в представленных в таблице сочетаниях). Например, ауксотроф, для роста которого необходим триптофан, будет расти только на чашках 3 и 9. По методу реплик можно отбирать мутанты, устойчивые к антибиотикам, однако рассев на чашках Петри рекомендуется при этом делать более плотным.

Существует также несколько приемов для повышения эффективности выхода ауксотрофных мутантов при отборе. Наиболее широко используется *метод обогащения ауксотрофов*. Были разработаны приемы, которые позволяли повышать частоту обнаружения ауксотрофных мутантов. Одним из таких приемов является *метод фильтрации*. Обработанные мутагеном конидии дикого типа

Таблица 6. Сочетания ростовых факторов для идентификации биохимических мутантов

Чашка		Чашка					
		1	2	3	4	5	6
	7	Аденин	Биотин	Фенилаланин	Аланин	Аргинин	Лейцин
	8	Гипоксантин	Фолиевая кислота	Серин	Цистеин	Орнитин	Глицин
	9	Цитозин	Пантотеновая кислота	Триптофан	Треонин	Аспарагиновая кислота	Изолейцин
	10	Гуанин	Пиридоксин	Тирозин	Тиосульфат	Пролин	Гистидин
	11	Тимин	Тиамин	Парааминобензойная кислота	Метионин	Глутаминовая кислота	Лизин
	12	Урацил	Рибофлавин	Никотиновая кислота	Холин	Инозит	Валин

предварительно инкубируют в жидкой минимальной среде, что позволяет прорасти прототрофным ядрам, а затем эту смесь фильтруют через ткань или фильтровальную бумагу с порами определенного диаметра, пропускающие непроросшие конидии, но задерживающие проросшие споры. Далее действуют по общей схеме использования реплик, приведенной выше. В среду для посева иногда добавляют сорбозу с целью индукции роста колоний. Выход ауксотрофов с применением метода фильтрации можно увеличить до 100 % и более. В этой методике важно правильно подобрать продолжительность предварительного инкубирования спор на минимальной среде для выбраковки прототрофов. Инкубирование лучше проводить при встряхивании, чтобы избежать слипания спор и слипания проросших ростков; ауксотрофные споры при длительном инкубировании также могут прорасти и анастомозировать, в результате чего может произойти комплементация ауксотрофных ядер. Время инкубации обычно подбирают в пределах 2—4 суток. Подход применим также для отбора многоядерных спор.

К физиологическим мутациям можно отнести мутации резистентности к антибиотикам, которые позволяют грибам расти на средах с ингибиторными дозами антибиотиков или тяжелых металлов. Эта категория мутаций весьма удобна, так как они селективны и часто бывают доминантными и полудоминантными. Му-

тации устойчивости к антибиотикам могут быть обусловлены нарушениями проницаемости клеточных мембран (например, резистентность к нистатину), дефектами цитоплазматических компонентов (например, рибосом в случае устойчивости к циклогексимиду) и т.д. Мутации устойчивости к беномилу у *A. nidulans* связаны с нарушениями микротрубочек веретена, а именно с секрецией белков тубулинов. Мутации устойчивости к лекарственным веществам можно отбирать путем рассева конидий на чашки Петри, содержащие летальные дозы данного вещества.

При изучении мутаций необходимо решить две основные задачи:

- определить ее физиологическую или биохимическую функцию;
- и прокартировать, т.е. привязать ее к определенной группе сцепления с другими локусами.

При картировании мутаций важное значение имеет проведение *теста на комплементацию*. Тест позволяет показать, аллельны или неаллельны мутации с потребностью к какому-либо определенному веществу, т.е. затрагивают они один или разные локусы:

a^-	b^+
a^+	b^-

если мутации *a* и *b* не аллельны, т.е. находятся в различных функциональных локусах, то гаплоидные фенотипы, объединившись в гетерокарионе, дадут прототрофный рост (дикий тип);

a'
a''

если мутации аллельны, т.е. затрагивают один и тот же функциональный локус, то гетерокарион тоже будет иметь мутантный фенотип, так как аллель дикого типа a^+ не присутствует, и не происходит комплементации.

Для грибов проведение теста на комплементацию значительно облегчено, так как можно сформировать гетерокарионы или диплоиды. Особенно просто проводить данные тесты на дрожжах с диплоидным жизненным циклом и на базидиомицетах с гапло-дикариотическим циклом. Проведение подобной процедуры не вызывает никаких затруднений для аксомицетного гриба *Podospora anserina*, у которого в норме образуются дикариотичные аскоспоры, и гораздо сложнее для *Ascobolus immersus* с одноядерными гаплоидными аскоспорами. Поэтому в тестах на комплементацию в случае с *A. immersus* использовали двуспоровые мутантные штаммы. Тесты на комплементацию позволяли строить целые карты комплементации, что наряду с рекомбинационными картами привело к наиболее полному картированию геномов различных видов грибов.

Тесты на комплементацию широко использовали при изучении ауксотрофных мутантов *Neurospora crassa*. Ввиду того что формирование гетерокарионов между штаммами нейроспоры и других грибов не всегда возможно по причине действия генов вегл. 4), была предложена методика формирования «вынужденных» (forced) гетерокарионов в отличие от сбалансированных, формирующихся естественным путем. Такой «вынужденный» гетерокарион был сформирован между двумя мутантными аланин-зависимыми штаммами на минимальной среде с добавкой аланина:

$am^2 \text{ arg-1} + am^3 \text{ arg-10}$ — «вынужденный» гетерокарион.

Оба исходных родительских штамма помимо потребности в аланине были также аргининзависимыми, причем, как было показано, мутации *arg-1* и *arg-10* были неаллельны и, следовательно, комплементарны, что позволяло гетерокариону расти на среде без аргинина, но с добавкой аланина. Однако рост данного гетерокариона на минимальном агаре без каких-либо добавок был не лучше, чем рост исходных гомотакаррионов am^2 и am^3 . Поэтому можно заключить, что мутации am^2 и am^3 аллельны и некомплементарны, т.е. находятся на одном локусе.

Направленный мутагенез (site-directed mutagenesis)

Молекулярная биология значительно расширила возможности получения направленных мутаций путем внесения генетических изменений в клонированные сегменты ДНК. Методы молекулярной биологии позволяют получать мутации, непосредственно воздействуя на активный центр белковой молекулы, т.е. получать мутации в строго определенном специфическом сайте какого-либо гена, а потом изучать эффекты этих мутаций на организм. Для этого в уже охарактеризованные и клонированные гены вносят специфические мутации и затем устанавливают корреляцию между изменениями в определенных участках этих генов (чаще всего в участках, соответствующих активным центрам белковых молекул) и измененным фенотипом. Возможно также с точностью локализовать регуляторные элементы данного гена. Например, если в кодирующую часть гена внести мутацию, то с него будет синтезироваться модифицированный полипептид. Это и позволит изучить влияние ак-последовательности белка как на его конформационную структуру, так и на ферментативную активность. Аналогично, нуклеотидная замена в предполагаемом регулярном участке может привести к подавлению или стимуляции транскрипции.

Существует несколько стратегий направленного мутагенеза. Одна из них, так называемый «кассетный» направленный мутагенез, основывается на вырезании короткой последовательности нуклеотидов с помощью рестриктаз и замене ее на синтетическую олигонуклеотидную последовательность, которая содержит измененную (мутантную) последовательность. Участок, в который хотят внести мутацию, вырезают из клонированного рекомбинантного вектора по двум фланкирующим уникальным рестрикционным сайтам и вместо него включают синтетический дуплексный олигонуклеотид, содержащий нуклеотидную замену и имеющий липкие концы, совпадающие с липкими концами в линейном векторе. Две цепи синтетического олигонуклеотидного дуплекса синтезируют отдельно и затем отжигают. Эта процедура возможна при наличии подходящих уникальных сайтов рестрикции, фланкирующих последовательность, которую мы хотим изменить (рис. 25). При дальнейшей трансфекции и клонировании измененного рекомбинанта геномов дикого типа не образуется.

Если подходящих сайтов рестрикции нет, то можно применить *олигонуклеотид-направленный мутагенез*, при котором синтезируют одноцепочечный олигонуклеотид, содержащий одну или несколько нуклеотидных замен в изучаемой области гена. Ген, в котором хотят получить мутацию, клонируют, например в фаге M13, и получают одноцепочечную кольцевую рекомбинантную вирусную ДНК. Затем с этой кольцевой молекулой отжигают синтетический олигодезоксинуклеотид (длиной от 8 до 20 н.п.), содержащий мутантную последовательность. Этот олигонуклеотид выполняет роль праймера для синтеза второй нити ДНК, а одноцепочечная плазмидная ДНК — роли матрицы при синтезе ДНК

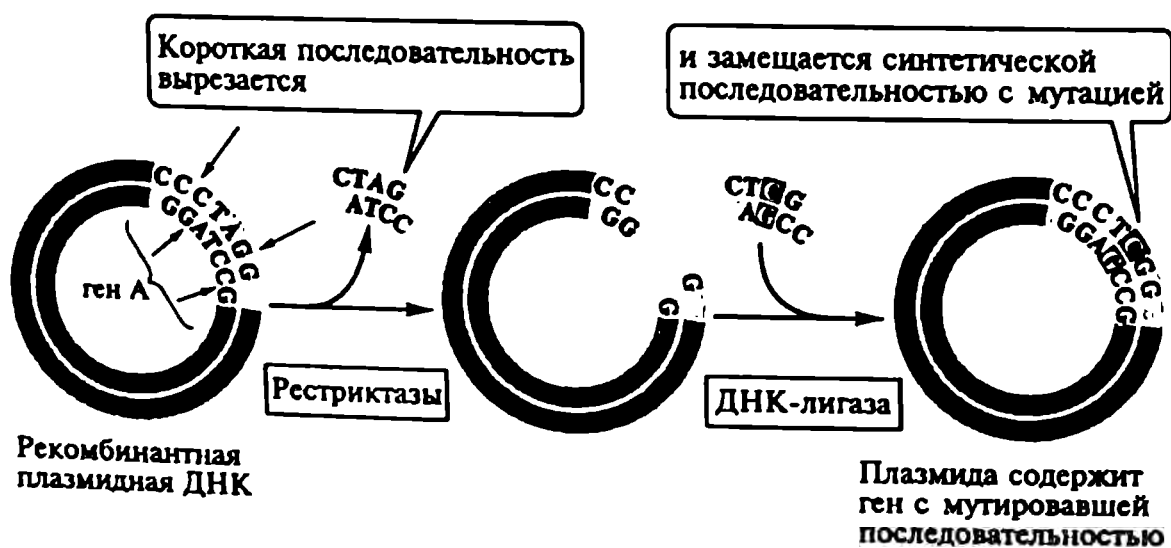


Рис. 25. «Кассетный» направленный мутагенез, при котором происходит вырезание короткой последовательности нуклеотидов с помощью ферментов рестрикции и замена ее

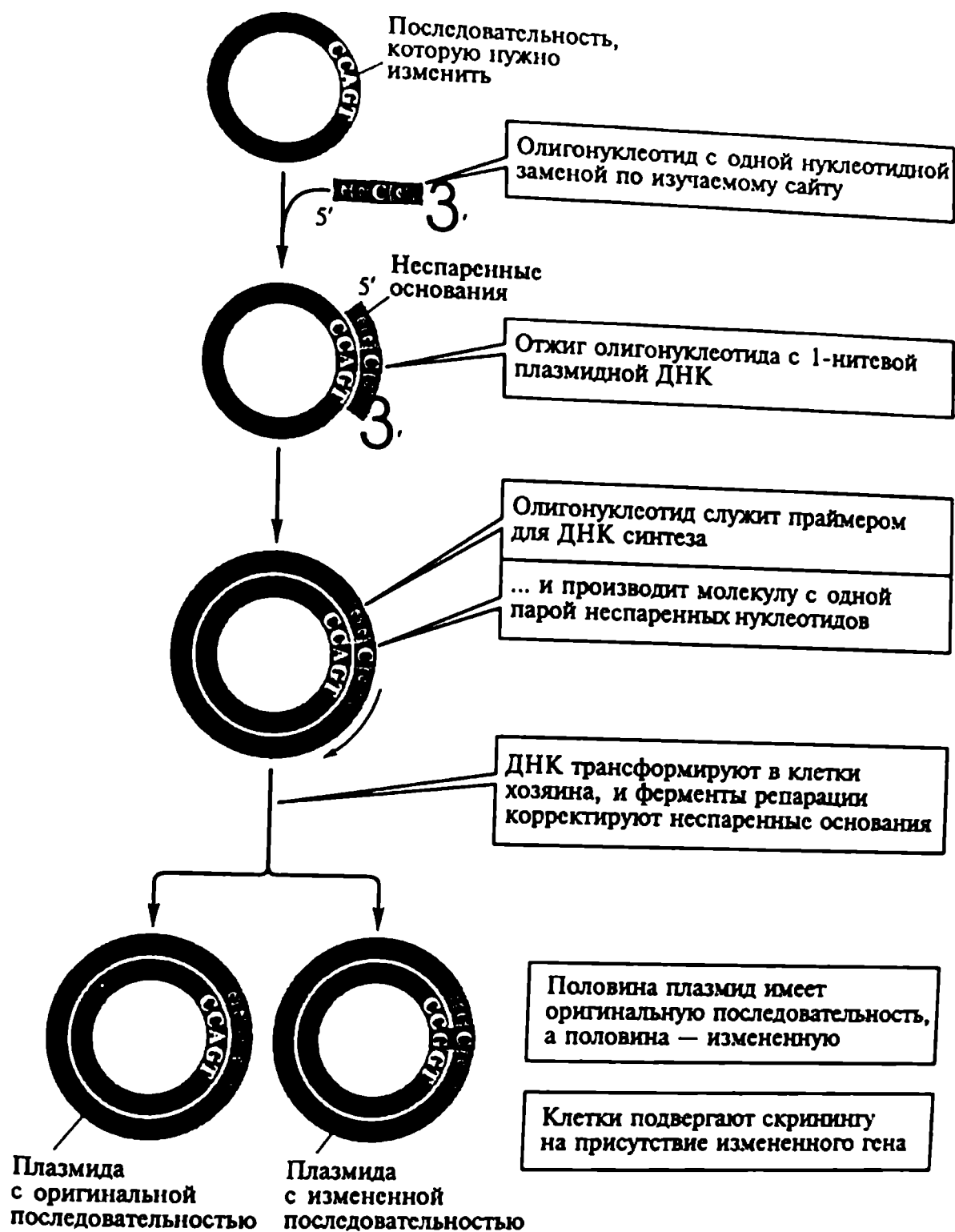


Рис. 26. Олигонуклеотид-направленный мутагенез, основанный на отжиге одонитевых молекул плазмидной ДНК с синтетическим олигонуклеотидным праймером, содержащим мутировавший сайт

in vitro с помощью ДНК-полимеразы I. После копирования всей кольцевой молекулы начало и конец новой цепи соединяют лигазой. Образовавшаяся дуплексная молекула содержит неспаренные основания в мутантной последовательности. Такую гибридную молекулу ДНК затем переносят (трансформируют) в ком-

пестентные клетки хозяина — бактериальные или дрожжевые. Неспаренные основания (мутантный сайт) во вновь синтезированной молекуле ДНК будут подвергаться репарации бактериальными ферментами хозяина, при этом половина репараций приведет к синтезу мутантных оснований, а половина — к синтезу нормальных исходных молекул ДНК дикого типа без внесенных нуклеотидных замен. Затем клетки хозяина подвергают скринингу на присутствие мутантных рекомбинантов (рис. 26).

Инсерционный и делеционный мутагенез

Эти разновидности современного мутагенеза, разработанные для изучения экспрессии генов и для постановки экспериментов по генной терапии, можно определить как мутагенез, опосредо-

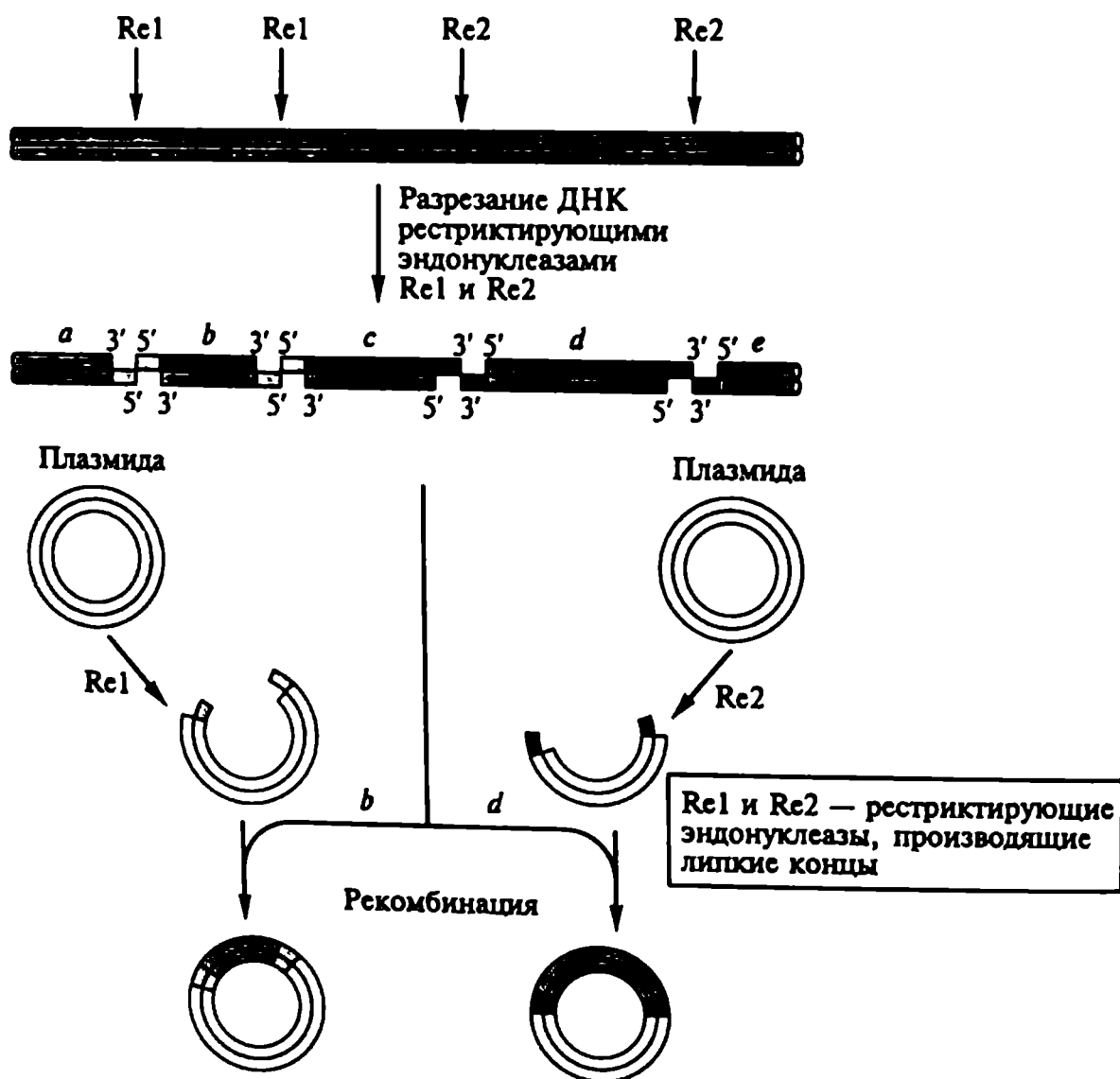


Рис. 27. Инсерции и делеции, опосредованные ферментами рестрикции (REI)

ванный ферментами рестрикции (*REMI* — restriction enzyme mediated insertion). Суть его состоит во встраивании специфических последовательностей в определенные или неспецифические случайные сайты генома хозяина. Случайное встраивание инъецированной ДНК в кодирующие или важные в регуляторном отношении участки может привести к изменению экспрессии гена-мишени. В результате может синтезироваться мутантный генный продукт или вообще блокироваться экспрессия данного гена. Такой подход широко используется в генетике прокариот, дрожжей и кукурузы. В качестве инсерционного мутагенного фактора могут быть использованы также транспозирующие мобильные элементы. Встроенный сегмент легко идентифицировать на ядерных ДНК-блотах и в геномных библиотеках, а затем его можно клонировать вместе с фланкирующими последовательностями генома-мишени.

Делеционные мутанты. Внести делецию в определенный участок можно с помощью рестриктирующих эндонуклеаз, при этом сайты рестрикции должны быть уникальны, т.е. клонированный фрагмент ДНК должен содержать два близко расположенных уникальных сайта рестрикции в интересующей области. После эндонуклеазного расщепления фрагмента образующиеся «хвосты» отщепляют с помощью специфической к одноцепочечным участкам нуклеазы, и тупые концы вновь сшивают (лигируют) (рис. 27).

Принцип конструирования *инсерционных мутантов* сходен. Клонированный сегмент ДНК расщепляют по одному из сайтов с помощью рестриктирующей эндонуклеазы или неспецифической эндонуклеазы. При необходимости заполняют пробелы на липких концах образовавшейся линейной молекулы или отщепляют одноцепочечные «хвосты» и осуществляют лигирование в присутствии сегмента, который хотят встроить в рекомбинантную плазмидную молекулу ДНК. Лигирование можно осуществлять как с липкими, так и с тупыми концами.

Глава 3

РЕКОМБИНАЦИИ

Рекombинации играют важную роль в макро- и микроэволюционных процессах, причем у грибов, в отличие от большинства других эукариот, рекомбинации протекают как в мейозе, так и в митозе. Генетическая рекомбинация является главным фактором, основой большинства изменений в геноме, которые служат материалом для отбора в микро- и макроэволюционных процессах. *Рекombинация* — это обмен генетической информацией между молекулами ДНК, что подразумевает несколько типов перераспределения наследственных факторов.

Различают 3 основных типа рекомбинаций:

- 1) *законная, или гомологичная*, или общая рекомбинация, включающая мейотическую и митотическую;
- 2) *незаконная, или негомологичная*;
- 3) *сайт-специфическая, или интегративная*.

Все три типа рекомбинаций отличаются не только механизмами, но и набором ферментов, обеспечивающих эти процессы.

Термин «*гомологичная рекомбинация*» (по сути, кроссинговер) говорит сам за себя: рекомбинируют протяженные гетероаллельные участки ДНК, что приводит к новому сочетанию сцепленных генов. В этих процессах участвуют специальные системы, так называемые *гес*-гены. Продукты этих генов — белки *рекомбиназы* (типа RecA-белка *E. coli*) помогают узнавать гомологичные последовательности. Таким образом, взаимодействие между рекомбинирующими гомологичными молекулами ДНК основано на взаимном узнавании и спаривании комплементарных цепей ДНК. При гомологичной рекомбинации происходит разрыв двух гомологичных участков ДНК и каждый из концов одного сегмента соединяется с соответствующими концами другого партнера таким образом, что обе образующиеся молекулы содержат разные фрагменты обоих участвующих в рекомбинации партнеров (рис. 28, а). Обычно гомологичная рекомбинация происходит между гомологичными и аллельными участками разных молекул ДНК, но она может произойти и между гомологичными, но неаллельными областями рекомбинирующих молекул. В этом случае один из продуктов рекомбинации утрачивает часть ДНК, а другой приобретает «лишний» сегмент. Такой процесс получил название *неравного кроссинговера* (рис. 28, б).

Эктотипическую рекомбинацию также можно рассматривать как один из частных случаев гомологичной рекомбинации. Она заключается в обменах (кроссинговерах) между отдельными гомологичными (но неаллельными) последовательностями ДНК, разбросанными по геному, например повторяющимися последовательностями ДНК, расположенными на одной хромосоме (рис. 28, в). В этом случае происходит потеря области, лежащей между сайтами рекомбинации, как это было показано для мобильных генетических элементов *Tu* дрожжей. Внутримолекулярные рекомбинации между обращенными повторами могут приводить к инверсии — повороту участка хромосом на 180° . Рекомбинация по прямым повторам между сестринскими хроматидами, или неравный кроссинговер, приводит к дупликациям и делециям (см. гл. 1).

Негомологичная рекомбинация осуществляется между негомологичными участками ДНК, часто при посреднической помощи мобильных элементов.

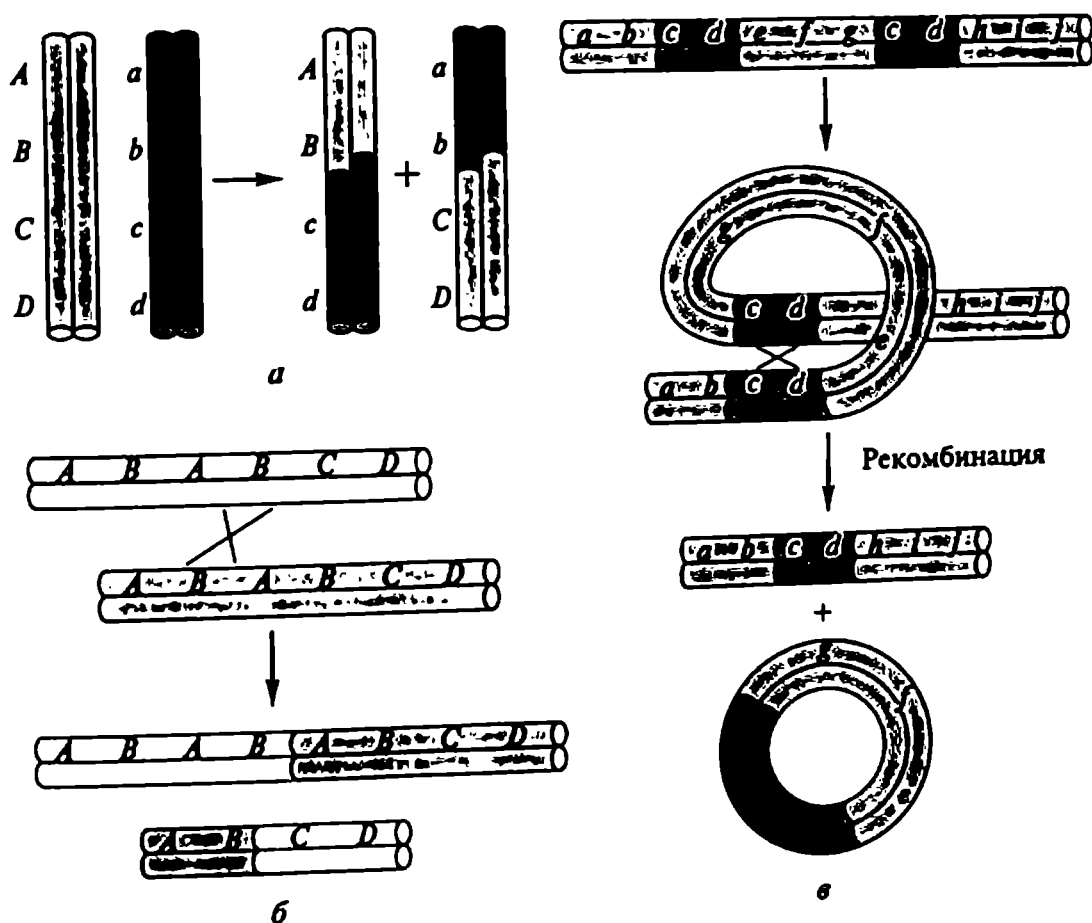


Рис. 28. Типы рекомбинаций:

a — гомологичная рекомбинация; б — неравный кроссинговер; в — эктотипическая (внутримолекулярная) рекомбинация

Этот тип рекомбинации происходит в клетках прокариот и дрожжей достаточно редко, а в клетках млекопитающих — весьма часто. Значение незаконных рекомбинаций в эволюции велико, так как данным способом могут осуществляться самые кардинальные перестройки геномов.

Сайт-специфическая рекомбинация — это обмен генетическим материалом на специфических, со строго определенными нуклеотидными последовательностями участках ДНК. Как правило, эти специфические короткие участки гомологий не превышают 15—30 н.п., т.е. сайты разрыва и воссоединения в двух рекомбинирующих молекулах находятся в пределах довольно коротких специфических гомологичных нуклеотидных последователь-

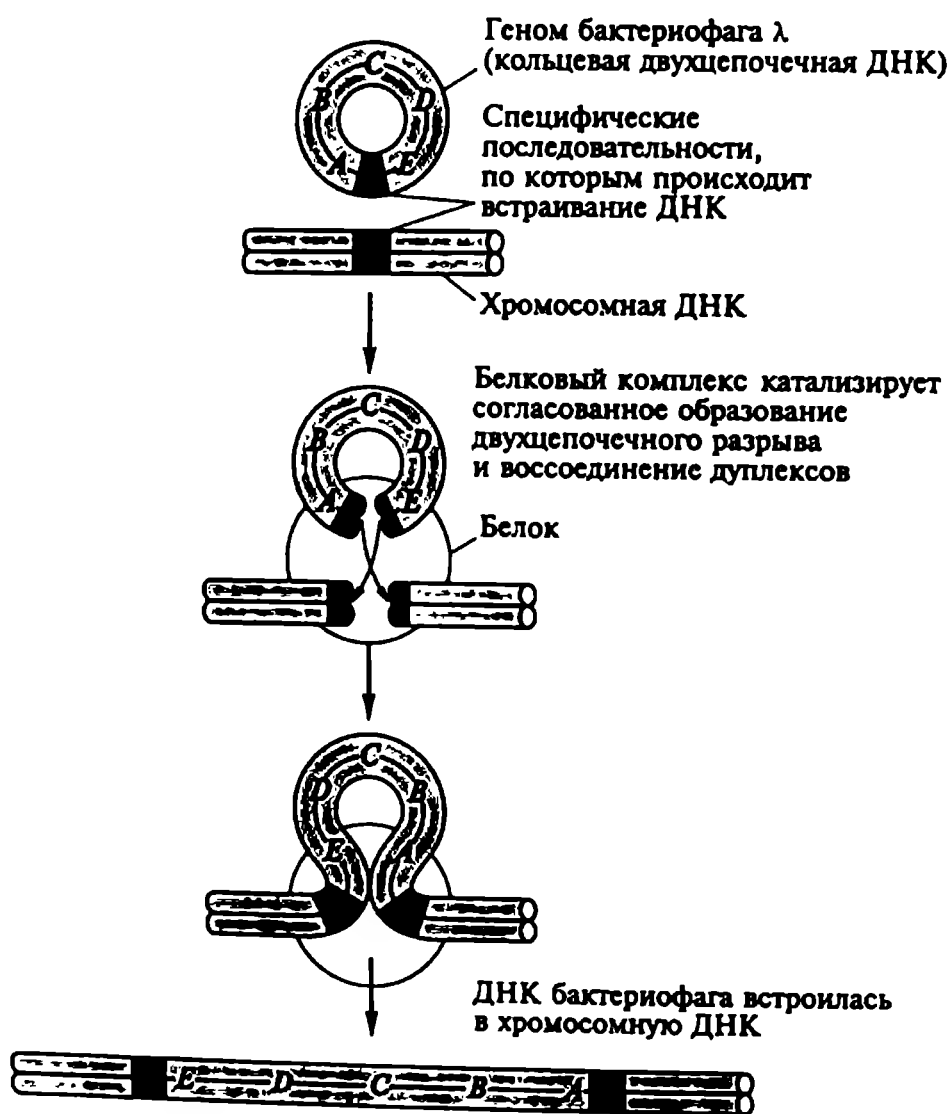


Рис. 29. Сайт-специфическая рекомбинация, при которой специфические последовательности имеются в обеих участвующих в рекомбинации ДНК

ностей. Сайт-специфическая рекомбинация часто связана с транспозициями мобильных генетических элементов в новые локусы и происходит при отсутствии гомологии между рекомбинирующими молекулами ДНК. Этот тип рекомбинации широко распространен среди прокариот и низших эукариот, в том числе и среди грибов. Например, мобильность интронов группы I обеспечивается сайт-специфическими эндонуклеазами, а мобильность транспозонов II класса, для которых характерна непосредственная транспозиция с ДНК на ДНК, обеспечивается разными *интегразами*. Этот тип рекомбинации называют также *интегративной*. Интегративная/эксцизионная рекомбинация в деталях изучена для бактериофагов λ с участием фермента *интегразы* (рис. 29).

Подводя итог, можно сказать, что общее отличие незаконной и сайт-специфической рекомбинаций от гомологичной заключается в *отсутствии протяженной гомологии* между рекомбинирующими участками ДНК. При гомологичной рекомбинации молекулы ДНК узнают друг друга путем прямого сопоставления их последовательностей с посредническим участием *рекомбиназ* типа белка RecA. Для этого в ДНК вводятся специальные пресинаптические повреждения, высвобождающие одноцепочечные участки ДНК, что и лежит в основе узнавания гомологичных последовательностей. RecA-зависимое внедрение одноцепочечной ДНК в гомологичный дуплекс и является первым этапом рекомбинационного процесса (детали процесса будут представлены далее в этой главе). Напротив, при сайт-специфической рекомбинации главную роль в синапсисе играет взаимное узнавание белков, связанных с рекомбинационными сайтами. Эти сайты короткие, и гомология между ними непосредственно для синапсиса несущественна. Она важна для связывания со специфическими белками и последующего обмена цепями между сайтами.

Гомологичная рекомбинация может инициироваться не только одностранными разрывами, но и двухнитевыми, как, например, у дрожжей. У *S. cerevisiae*, по крайней мере, 11 белков требуется для инициации мейотической рекомбинации. Примеры: Spo11 (spindle pole body) — II топоизомеразоподобный белок, образующий запрограммированные двухнитевые разрывы ДНК (DSB — double strand breaks); Rad50-Mre1-комплекс. Мутации по гену *rad50* блокируют формирование точных двунитевых разрывов ДНК во время зигонемы профазы I. Белок Rad51, как и его прокариотический гомолог RecA, обладает АТФ-зависимой активностью, способствующей обмену цепями ДНК. Эукариотические гомологи *recA*-генов были обнаружены у многих других видов, например, ген *ccrad51* у *Coprinus cinereus*.

В этой главе рассмотрен механизм гомологичной, или законной, рекомбинации.

Мейотическая, или половая, рекомбинация

Мейоз у грибов имеет свои особенности. У большинства грибов мейоз *закрытого типа*, т. е. протекает в пределах ядерной мембраны. Мейоз состоит из двух последовательных ядерных делений (I и II) при одном синтезе ДНК. Синтез ДНК в фазе S, когда удваивается число хромосом, называют *репликативным*. Во время *интерфазы* хромосомы имеют вид тонких диффузных нитей. После репликации сестринские хроматиды остаются тесно связанными между собой центромерами и начинают конденсироваться, что указывает на начало *профазы I* мейотического деления.

Профаза I продолжительна и состоит из пяти этапов: *лептоне-мы*, *зигонемы*, *пахинемы*, *диплонемы* и *диакинеза* (рис. 30). У дрожжей спаривание хромосом начинается на стадии *лептоне-мы* и продолжается в *зигонеме*. Синаптонемный комплекс формируется в *пахинеме*. Кроссинговер начинается в *зигонеме*, прежде чем появится синаптонемный комплекс, и завершается почти в конце профазы I. На стадии *зигонемы* (стадия сливающихся нитей) гомологичные нити начинают попарно конъюгировать, образуя биваленты. Затем на стадии *пахинемы* происходит кроссинговер (перекрест) хромосом между гомологами (бивалентами), состоящими из двух хроматид, связанных между собой центромерой. В *диплонеме* центромеры спаренных гомологичных хромосом начинают расходиться, что влечет за собой расхождение гомологов, соединенных между собой хиазмами, которые являются результатом кроссинговера. Таким образом, расходятся пары сестринских хромосом (биваленты), несущие по две хроматиды. На

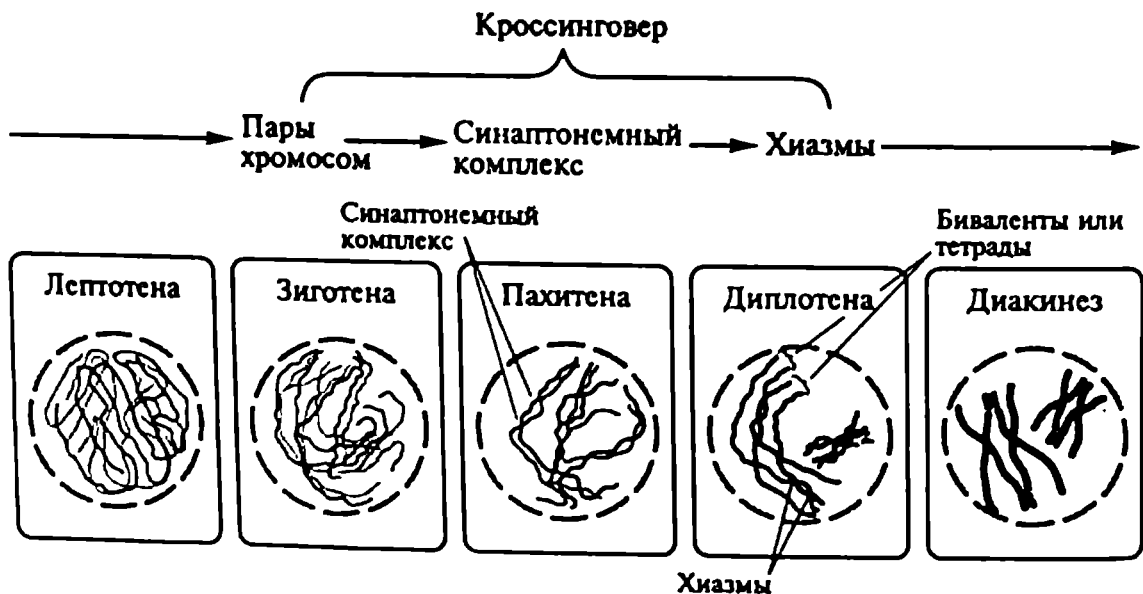


Рис. 30. Стадии профазы I мейотического деления, где происходит кроссинговер

стадии *диакинеза* происходит дальнейшее расхождение гомологичных хромосом, при этом хромосомы конденсируются, а хиазмы мигрируют по направлению к концам хромосом, где они и «сползают». Поэтому гомологи (хроматиды) остаются спаренными только на кончиках. В конце профазы I формируется веретено.

В *метафазе I* деления созревания пары хромосом располагаются в экваториальной плоскости. Во время *анафазы I* разделяются хромосомы (биваленты), несущие по две хроматиды, а в *анафазе II* расходятся (сегрегируют) хроматиды. В результате I деления число хромосом в клетке уменьшается (n), но количество ДНК сохраняется (так как каждая хромосома, или бивалент, имеет по две хроматиды). Расхождение хроматид во II делении сопровождается делением центромер.

Другая особенность мейоза у грибов заключается в наличии *полярного тела веретена* (spindle pole body — SPB) вместо центриолей, которые формируют веретено.

Итак, в *пахинеме* профазы I каждая хромосома состоит из двух хроматид, гомологи которых способны конъюгировать, и хроматиды связаны между собой центромерой. Такие *биваленты* располагаются линейно, и между ними образуется *синаптонемный комплекс* (СК). Эта структура появляется между парами гомологичных хромосом в *пахинеме* и исчезает или становится фрагментированной в последующей *диплонеме*. Данное образование можно рассмотреть на электронной фотографии, поймав стадию *пахинемы*. Тогда заметно, что с помощью СК концы хромосом ассоциированы с внутренней ядерной мембраной. СК формируется по всей длине гомологов, и его появление связано с синапсисом (перекрестом) хромосом. Однако сам СК не обеспечивает узнавание гомологов, необходимое для правильного синапсиса, т.е. формирование СК не является определяющим для инициации рекомбинации, но он необходим для конверсии (превращения) рекомбинирующих интермедиатов в зрелые продукты и расхождения (disjunction) гомологичных хромосом. Это было продемонстрировано на мутантах дрожжей с нарушениями на ранних стадиях мейотической рекомбинации (early meiotic recombination mutants), которые были не способны образовывать запрограммированные двунитевые разрывы ДНК и не способны формировать СК.

Иногда СК может формироваться между нехомологичными хромосомами или хромосомными участками, что также косвенно свидетельствует о том, что СК не нужен для инициации рекомбинации, но он необходим, по-видимому, для конверсии (превращения) рекомбинирующих интермедиатов в зрелые продукты, что обеспечивает расхождение гомологичных хромосом. Однако не у всех грибов обнаружен синаптонемный комплекс. Например, отсутствие СК у таких видов, как *Aspergillus nidulans*,

Schizophyllum commune, ведет к тому, что пересортировка возможна только на уровне целых хромосом.

У *недикариофитных грибов* (например, зигомицетов) после редукционного деления (мейоза) происходят многочисленные митозы, что приводит к многократному копированию продуктов первичного мейотического расщепления. В этом случае обычный анализ менделевского расщепления будет затруднен и необходимо проводить статистический анализ расщепления признаков.

У *дикариофитных грибов*, к которым относится большинство аскомицетов и базидиомицетов, можно непосредственно наблюдать продукты мейотического деления (4 аскоспоры в сумке или 4 базидиоспоры на базидии).

У мицелиальных *сумчатых грибов* мейоз сопровождается одним последующим митозом, в результате чего в сумке образуется 8 аскоспор. Поэтому в этом случае можно проводить абсолютный (а не вероятностный) анализ расщепления признаков. Впервые подобный анализ проделал К. Линдегрен на *Neurospora crassa*, что и положило начало тетрадному анализу. *Тетрадный анализ* фактически демонстрирует природу мейоза, точный порядок расхождения генов при мейотическом делении. Проведение тетрадного анализа основывается на технике микроманипулирования, что позволяет изолировать отдельные сумки, переносить их на агаровые пластинки и анализировать генотипы конкретных аскоспор.

У грибов встречаются упорядоченные и неупорядоченные тетрады. Наиболее простым для понимания является анализ, проводимый на *упорядоченных тетрадах*, которые обнаружены у таких аскомицетов, как *Neurospora*, *Venturia*, *Sordaria*. Для этих грибов характерно также то, что два веретена во II мейотическом делении направлены к различным полюсам сумки; они не перекрываются, поэтому конечные продукты мейоза располагаются в таком же порядке, что и при I мейотическом делении. *Неупорядоченные тетрады* обнаружены у большинства *дрожжей*, у грибов из родов *Ascobolus*, *Aspergillus* и др.

Прежде всего с помощью тетрадного анализа было доказано, что кроссинговер проходит на стадии четырех, а не двух хроматид. Так, простой анализ расщепления признака окраски аскоспор у *N. crassa* фактически позволяет «проследить за аллелями», что дает прямые доказательства биологической природы расщепления (рис. 31). Допустим, имеется зигота, гетерозиготная по нормальному аллелю (+) (пигментация в прилегающей стенке аскоспоры, дающая темную окраску аскоспор), с аллелем *a*, который потерял эту функцию (светлая окраска аскоспор). На рисунке представлены различные возможные варианты, являющиеся результатом разных случаев кроссинговера. Так, если бы перекрест произошел между изучаемым локусом и центромерой на стадии

двух нитей, то во всех сумках лежали бы последовательно 4 пигментированные и 4 светлые аскоспоры. Если кроссинговер происходит на стадии четырех нитей, то возможны различные варианты расположения аскоспор в сумках, представленные на рис. 31.

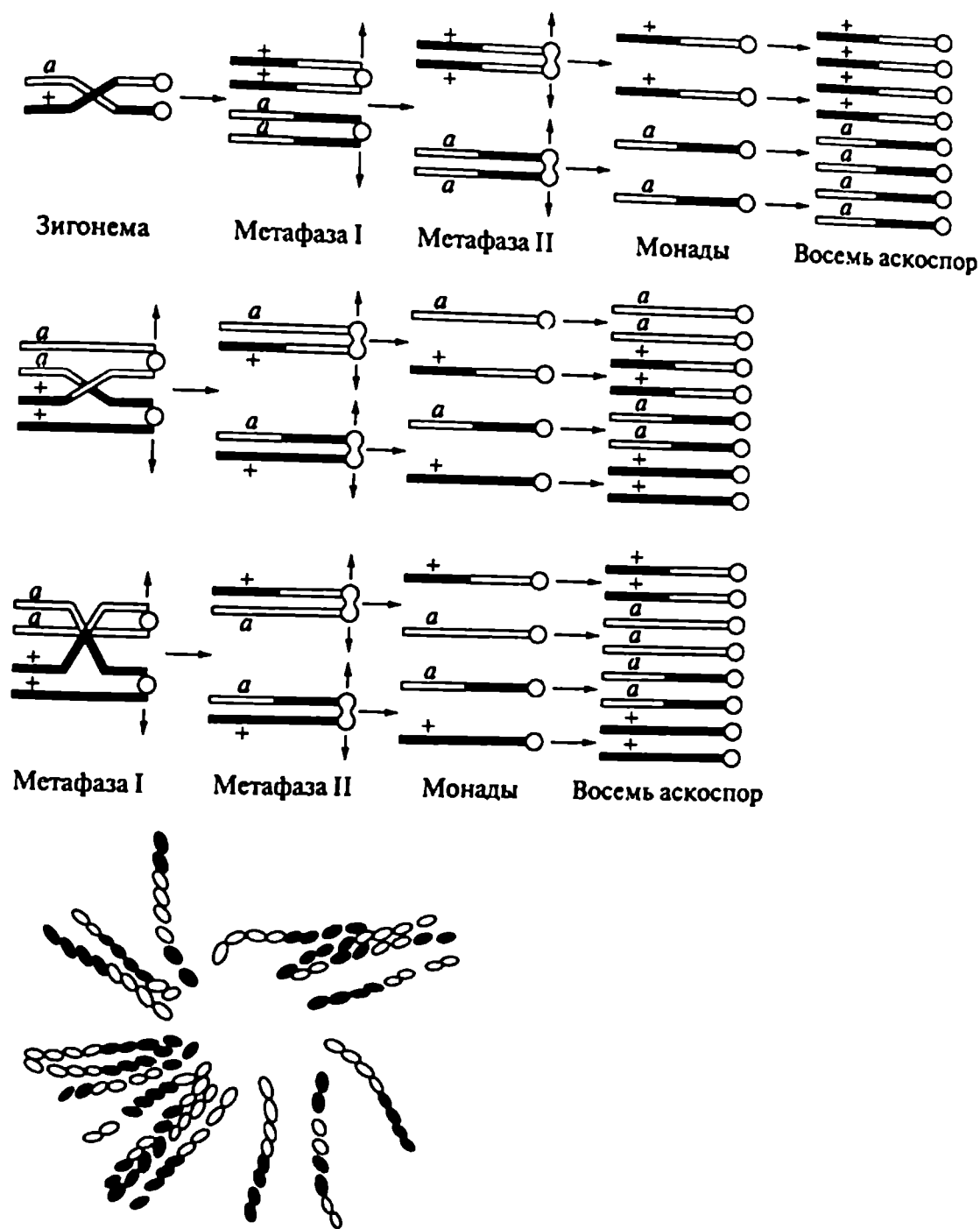
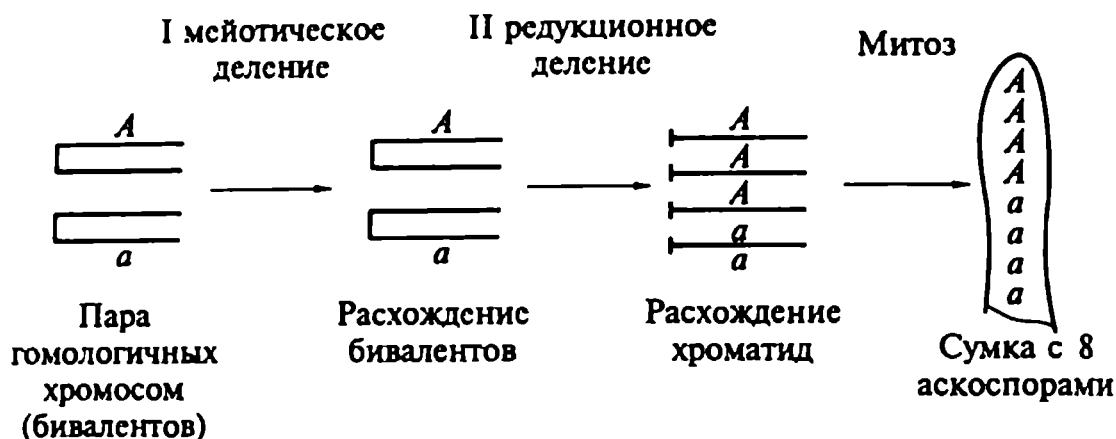


Рис. 31. Тетрадный анализ на нейроспоре, дающий по положению аскоспор в сумке прямые доказательства прохождения кроссинговера на стадии четырех нитей. Объяснение см. в тексте

Тетрадный анализ моногибридного скрещивания

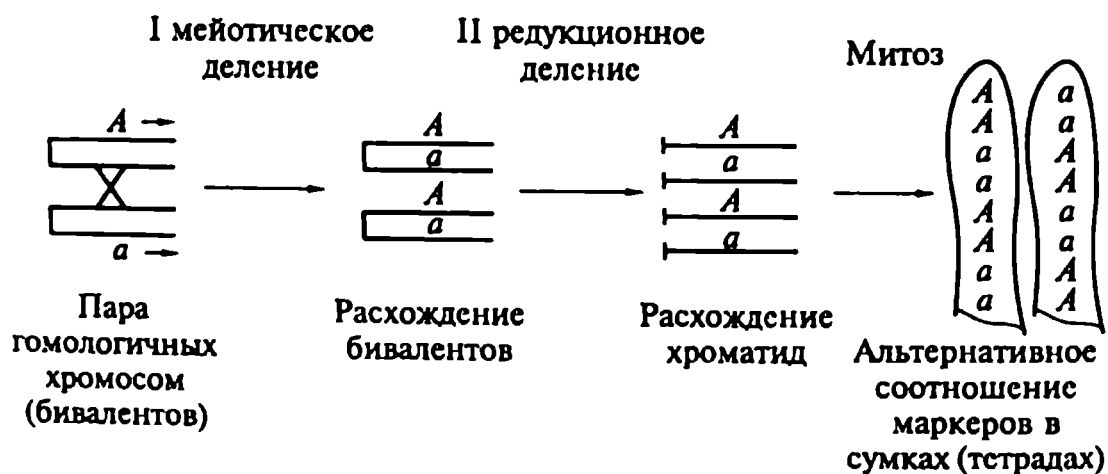
Рассмотрим варианты рекомбинаций, которые можно обнаружить при анализе содержимого сумок на примере упорядоченных тетрад *Neurospora crassa*.

А. Кроссинговер не происходит при скрещивании гаплоидов, различающихся по альтернативным признакам A и a . Получаем диплоид Aa , который вступает в мейотическое деление и образует аскоспоры:



В профазе I после синтеза ДНК каждая хромосома состоит из двух хроматид, гомологи которых способны конъюгировать, и хроматиды связаны между собой центромерой. Если кроссинговера (обмена) между центромерой и локусом A не происходит, то уже после I мейотического деления наблюдаем расхождение маркеров A и a . Расположение данных маркеров в сумке будет $4A : 4a$.

Б. Кроссинговер происходит на участке между центромерой и локусом A :



Если конъюгируют несестринские гомологичные хроматиды (вторая и третья), то после I мейотического деления расхождения маркеров не наблюдается, а последующая постредукция приведет к альтернативному соотношению маркеров в тетрадах; при

этом по первой и четвертой хроматидам расхождения маркеров не происходит.

В. Кроссинговер происходит на участке между центромерой и локусом *A*, и обмениваются вторая и четвертая несестринские хроматиды:



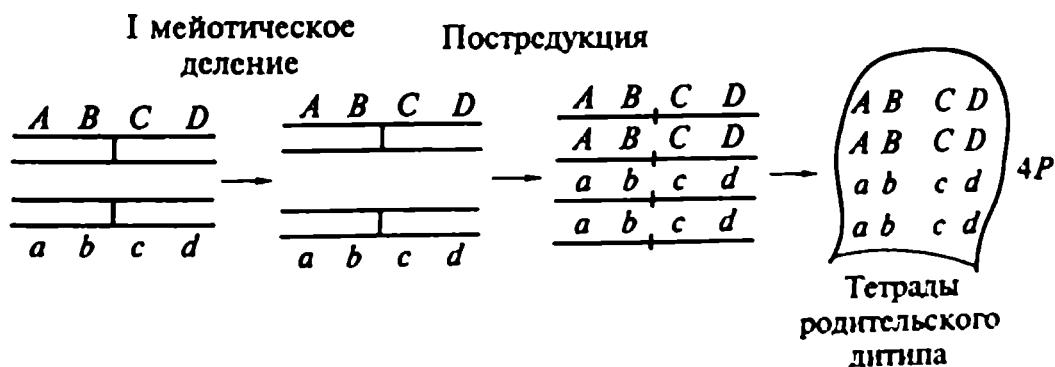
Расхождение маркеров после I мейотического деления не происходит (оба ядра гетерозиготны), а последующая постредукция даст *симметричные тетрады*.

Г. В случае сумок с *неупорядоченным* расположением спор, как, например, у *Aspergillus (Emericella)*, всегда будем получать расщепление признаков $4A \ 4a$ или, как у дрожжей, $2A \ 2a$.

Тетрадный анализ дигибридного скрещивания со сцепленными локусами

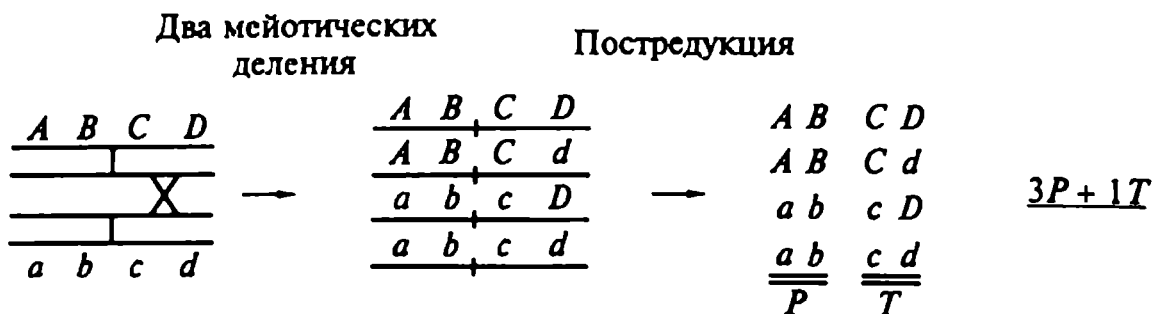
Рассмотрим *дигибридный анализ* для сцепленных локусов.

А. Кроссинговер не происходит. Родительские гаплоиды различаются по четырем признакам — *A, B, C, D*, и данные локусы сцеплены с центромерой, причем центромера расположена между локусами *B* и *C*. При скрещивании гаплоидов, различающихся по четырем альтернативным признакам *A, B, C, D*, получается гетерозиготный диплоид, который подвергается мейотическому делению, в результате чего образуются тетрады аскоспор с сочетанием признаков, соответствующих родительским гаплоидам.



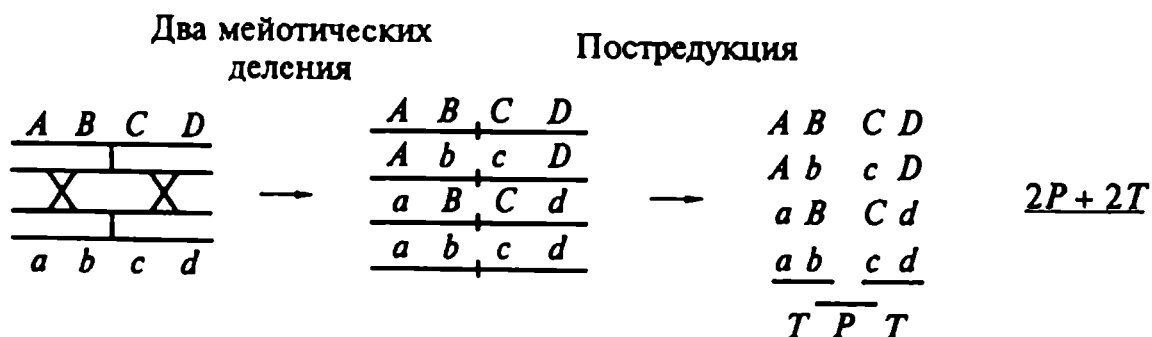
Расхождение маркеров происходит после I мейотического деления. В результате последующей постредукции получаются тетрады *родительского дитипа* (*PD*, или *P*, parental ditype). Тетрады родительского дитипа *P* представляют каждый из двух родительских генотипов.

Б. Происходит одиночный кроссинговер (обмен) между второй и третьей несестринскими гомологичными хроматидами на участке между локусами *C* и *D*:



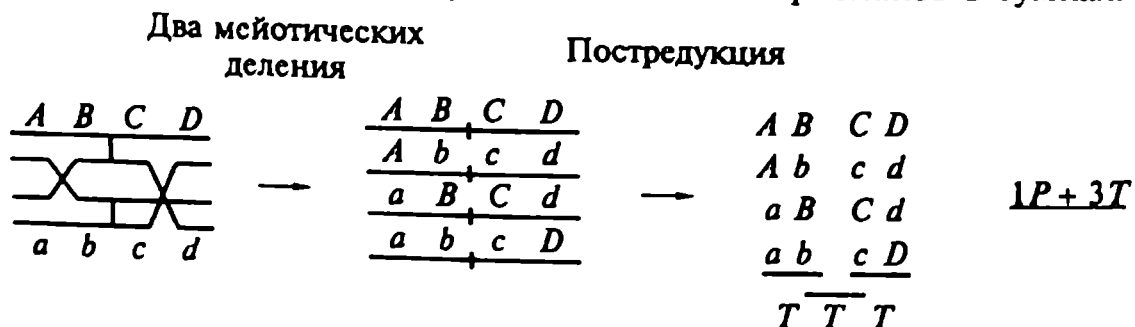
Получаются тетрады *родительского дитипа P* (по локусам *A* и *B*) и тетрады *тетратипа T* (*T*, tetratype) (по локусам *C* и *D*). Тетрады тетратипа представлены как обеими родительскими генотипами, так и рекомбинантными генотипами (*Cd*, *cD*), т.е. присутствуют все возможные комбинации локусов *C* и *D*.

В. Происходит двойной двухнитевой кроссинговер, при котором обмениваются вторая и третья хроматиды:



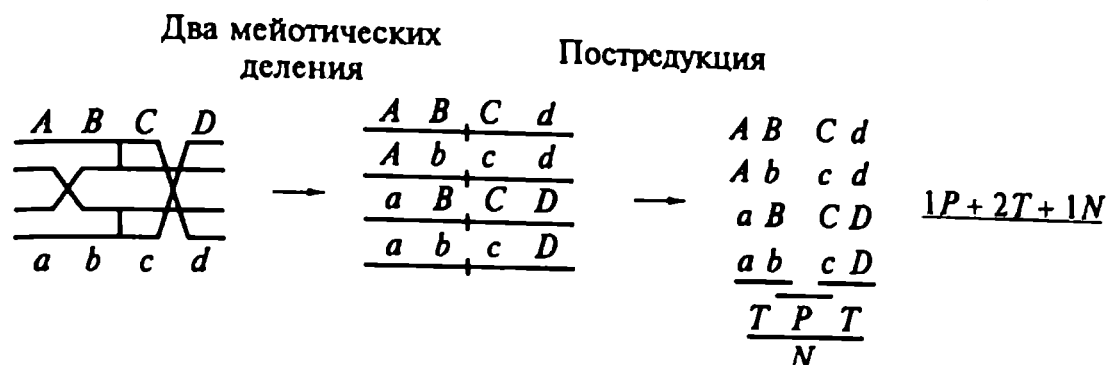
Расхождение маркеров происходит уже после I мейотического деления. В сумках получаются следующие сочетания маркеров: по локусам *B* и *C*, *A* и *D* — родительские дитипы *P* и два тетратипа *T* — по локусам *A* и *B*, *C* и *D*.

Г. В случае двойного трехнитевого кроссинговера, при котором обмениваются три хроматиды (вторая с третьей и третья с четвертой), получаем следующие сочетания признаков в сумках:



В результате трехнитевого обмена получаются три тетратипа — по локусам A и B , C и D , A и D и один родительский дитип по локусам B и C .

Д. И наконец, рассмотрим случай четырехнитевого двойного кроссинговера, при котором обмениваются все четыре хроматиды:



В результате четырехнитевого кроссинговера получается новый тип тетрад — тетрады *неродительского дитипа* (NPD , или N , *non-parental ditype*), которые представляют собой оба рекомбинантных генотипа по локусам A и D (т.е. комбинации A и d , a и D).

Исходя из всех представленных выше вариантов нетрудно заметить следующую закономерность: при отсутствии обменов получается только родительский дитип P , при наличии одного обмена появляется один рекомбинантный тетратип ($1T$), при двойном двухнитевом кроссинговере — два тетратипа ($2T$). Таким образом, при увеличении числа обменов (кроссинговеров) возрастает частота замен родительского дитипа на тетратип, т.е. возрастает число тетрад тетратипа T .

Соотношение частоты замен родительского дитипа P на тетратип T следующее:

$2x : 3x : 4x = 1/4 : 1/2 : 1/4$, т.е. максимальная частота замен P на T наблюдается при трехнитевых кроссинговерах.

Число тетратипов и родительских дитипов можно рассчитать по формулам:

$$T_N = \frac{T(N-1)}{2}; P_N = N_N = \frac{T(N-1)}{4},$$

где N — число обменов (кроссинговеров); P_N — число родительских дитипов.

Очевидно, что при сцеплении локусов число родительских дитипов P будет превышать число неродительских (рекомбинантных) дитипов N ($P > N$).

Тестом на сцепление генов служит отклонение от соотношения $P : N = 1 : 1$, которое оценивается с помощью χ^2 -теста:

$$\chi^2 = \frac{(P - N)^2}{P + N},$$

где P — число родительских дитипов; N — число неродительских дитипов (рекомбинантов).

При увеличении доли N происходит неслучайная пересортировка (non-random assortment) хромосомных пар. Если частота тетрад тетратипа T значительно меньше P и N тетрад, при этом $P = N$, значит, сегрегирующие маркеры (например, a и b) не сцеплены и находятся на разных хромосомах, но довольно близко к центромере.

Интерференция

Обмены в одной области хромосомы влияют на обмены в другой области на этой же хромосоме. В подобных случаях имеет место так называемая *интерференция*, при которой число фактически наблюдаемых кроссинговеров уменьшается по сравнению с числом ожидаемых двойных. Интерференция — это явление, когда кроссинговер в одной области влияет на возможность кроссинговера в другой области в одном и том же мейотическом биваленте. Хроматидная интерференция может быть как положительной, так и отрицательной, в зависимости от уменьшения или увеличения влияния. В случае положительной интерференции наблюдается избыток четырехнитевых над двухнитевыми двойными обменами. В целом интерференция снижает частоту обменов. Это явление можно изучать как с тетрадами аскоспор, так и с отдельными мейотическими продуктами.

Например, подсчитывали количество кроссоверных тетрад при сегрегации признаков (мутантных аллелей), находящихся на плече I хромосомы *Neurospora crassa* (O. Perkins, 1962):

<i>cr</i>	<i>thi-1</i>	<i>nit</i>	<i>aur</i>	<i>nic-1</i>	<i>os</i>	(чувствительность к высокому осмотическому давлению)
-----------	--------------	------------	------------	--------------	-----------	--

Всего было проанализировано 1262 сумки, из них:

- 8 % — нет кроссоверов,
- 44 % — одинарные кроссоверы,
- 40 % — двойные кроссоверы,
- 7 % — тройные кроссоверы,

т.е. соотношения отклоняются от распределения Пуассона (23, 34, 24, 12). Следовательно, формирование одного перекреста снижает возможность других, т.е. наблюдается преимущество одинарных обменов перед двойными и тройными. Если пуассоновское распределение выполняется, то интерференция практически отсутствует, как это было показано для некоторых групп сцепления *Aspergillus nidulans* (W. Strickland, 1958). Вероятно, разные виды грибов значительно отличаются по интенсивности хиазмных интерференций.

Оценить степень интерференции можно путем расчета коэффициента коинциденции C (coincidence). По мере уменьшения расстояний, разделяющих три гена, интерференция увеличивается, и наоборот. Коэффициент C показывает степень совпадения наблюдаемого числа кроссинговеров с ожидаемым в определенной группе сцепления:

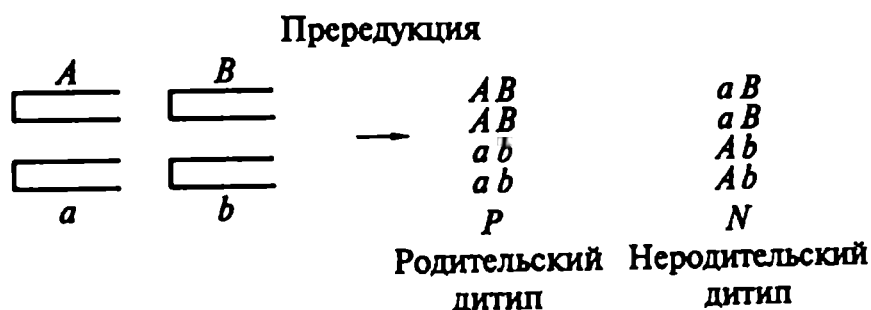
$$C = \frac{\text{Фактически полученное число двойных кроссовров}}{\text{Ожидаемое число двойных кроссовров}}.$$

Экспериментальными расчетами было показано, что интерференция не происходит на участках, близких к центромере.

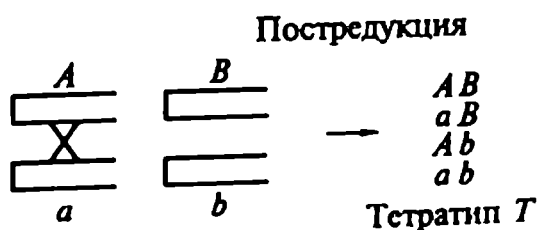
Дигибридный анализ несцепленных генов

Рассмотрим ситуацию, при которой гены расположены на разных хромосомах, т.е. не сцеплены друг с другом.

Гетерозиготный диплоид по альтернативным признакам A/a и B/b в случае отсутствия кроссинговера на обеих хромосомах (на участках между каждым из локусов и центромерой) даст тетрады родительского P и неродительского N дитипов в равном соотношении:



Если обмен совершается только в одной хромосоме, т.е. постредукция происходит по одной хромосоме, то образуется тетра-тип T :



При обмене на обеих хромосомах постредукция также наблюдается по двум хромосомам. В результате получается родительский дитип, тетратип и другие комбинации, которые можно представить с помощью решетки Р. Пеннета (табл. 7):

$$\begin{array}{c}
 AB \\
 ab \\
 AB \\
 \hline
 Ab \\
 \hline
 P
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{c}
 AB \\
 ab \\
 aB \\
 \hline
 Ab \\
 \hline
 T
 \end{array}
 + \text{Другие комбинации}$$

Родительский дитип Тетратип

Таблица 7. Решетка Р. Пеннета, демонстрирующая все возможные варианты тетрад при дигибридном скрещивании с несцепленными локусами

Аллели	<i>AAaa</i>	<i>aaAA</i>	<i>AaAa</i>	<i>aAaA</i>	<i>AaaA</i>	<i>aAAa</i>
<i>BBbb</i>	<i>AB</i> <i>AB = P</i> <i>ab</i> <i>ab</i>	<i>aB</i> <i>aB = N</i> <i>Ab</i> <i>Ab</i>	<i>aB</i> <i>aB = N</i> <i>Ab</i> <i>ab</i>	<i>aB</i> <i>AB = T</i> <i>ab</i> <i>Ab</i>	<i>AB</i> <i>aB = T</i> <i>ab</i> <i>Ab</i>	<i>aB</i> <i>AB = T</i> <i>Ab</i> <i>ab</i>
<i>BbBB</i>	<i>Ab</i> <i>Ab = N</i> <i>aB</i> <i>aB</i>	<i>ab</i> <i>ab = P</i> <i>AB</i> <i>AB</i>	<i>Ab</i> <i>ab = P</i> <i>AB</i> <i>aB</i>	<i>ab</i> <i>Ab = T</i> <i>aB</i> <i>AB</i>	<i>Ab</i> <i>ab = T</i> <i>aB</i> <i>AB</i>	<i>ab</i> <i>Ab = T</i> <i>AB</i> <i>aB</i>
<i>BbBb</i>	<i>AB</i> <i>Ab = T</i> <i>aB</i> <i>ab</i>	<i>aB</i> <i>ab = T</i> <i>AB</i> <i>Ab</i>	<i>AB</i> <i>ab = T</i> <i>AB</i> <i>ab</i>	<i>aB</i> <i>Ab = N</i> <i>aB</i> <i>Ab</i>	<i>AB</i> <i>ab = T</i> <i>aB</i> <i>Ab</i>	<i>aB</i> <i>Ab = T</i> <i>AB</i> <i>ab</i>
<i>BBbB</i>	<i>Ab</i> <i>AB = T</i> <i>ab</i> <i>aB</i>	<i>ab</i> <i>aB = T</i> <i>Ab</i> <i>AB</i>	<i>Ab</i> <i>aB = T</i> <i>Ab</i> <i>aB</i>	<i>ab</i> <i>AB = P</i> <i>ab</i> <i>AB</i>	<i>Ab</i> <i>aB = T</i> <i>ab</i> <i>AB</i>	<i>ab</i> <i>AB = T</i> <i>Ab</i> <i>aB</i>
<i>BbbbB</i>	<i>AB</i> <i>Ab = T</i> <i>ab</i> <i>aB</i>	<i>aB</i> <i>ab = T</i> <i>Ab</i> <i>AB</i>	<i>AB</i> <i>ab = T</i> <i>Ab</i> <i>aB</i>	<i>aB</i> <i>Ab = T</i> <i>ab</i> <i>AB</i>	<i>AB</i> <i>ab = P</i> <i>ab</i> <i>AB</i>	<i>aB</i> <i>Ab = N</i> <i>Ab</i> <i>aB</i>
<i>bBBb</i>	<i>Ab</i> <i>AB = T</i> <i>aB</i> <i>ab</i>	<i>ab</i> <i>aB = T</i> <i>AB</i> <i>Ab</i>	<i>Ab</i> <i>aB = T</i> <i>AB</i> <i>ab</i>	<i>ab</i> <i>AB = T</i> <i>aB</i> <i>Ab</i>	<i>Ab</i> <i>aB = N</i> <i>aB</i> <i>Ab</i>	<i>ab</i> <i>AB = P</i> <i>AB</i> <i>ab</i>

Получаемые статистические соотношения генотипов выполняются при отсутствии сцепления между локусами:

$$P \quad N \quad T = 1/4 \quad 1/2 \quad 1/4; \quad P = N, \quad T = 2/3.$$

Поэтому если в эксперименте получаются частоты P , N и T , достоверно не отличающиеся от теоретически ожидаемых, и соотношения проверены с помощью метода χ^2 , то можно сделать заключение об отсутствии сцепления между локусами.

При изучении расщепления признаков можно получить следующие соотношения тех или иных типов тетрад.

N-распределение (нормальное распределение):

$$P : N \quad T = 1 \quad 1 \quad 4;$$

$$P = N, \quad T = 2/3.$$

Полученные соотношения чисто статистические и свидетельствуют о том, что гены достаточно удалены друг от друга и локусы не сцеплены.

F-распределение:

$$P = N, \quad T < 2/3$$

означает, что локусы расположены на разных хромосомах, а уменьшение доли образующихся рекомбинантных тетратипов указывает на то, что локусы могут быть расположены рядом с центромерой. Эти соотношения обусловлены тем, что возникновение дитипов не связано с кроссинговерами между генами и центромерой, в то время как для появления тетратипов необходима рекомбинация и между генами, и между генами и центромерой. Чем ближе к центромере расположены исследуемые гены, тем меньше вероятность появления тетратипов.

L-распределение указывает на сцепление локусов:

$$P > N, \quad T < 2/3.$$

Родительский дитип P преобладает над неродительским (рекомбинантным) дитипом N , и наблюдается сцепление генов.

Таким образом, изучая статистические распределения частот тетрад различных типов, можно сделать первый шаг к картированию генов.

Картирование генов

Прежде всего можно рассчитать расстояние изучаемого локуса от центромеры:

$$\% \text{ кроссинговера (ед. кроссинговера)} = \frac{\% \text{ постредукционных (кроссоверных) тетрад}}{2}$$

(деление на 2, потому что две из 4 хроматид обмениваются).

Пример 1. При скрещивании мутантного родителя со светло-окрашенными перитециями *Sordaria fimicola* (мутация *tan*) с диким типом получали:

$tan \times d.t. \rightarrow 56\%$ кроссоверных асков (т.е. 56 асков кроссоверных на 100 тетрад), значит, расстояние локуса *tan* от центromеры составляет 28 ед. кроссинговера.

Пример 2. Мутация *gray* у *Sordaria fimicola*:

$gray^- \times gray^+ \rightarrow 2/3 \sim 66\%$ асков кроссоверных, т.е. расстояние локуса *gray* от центromеры составило 33 ед. кроссинговера.

Однако при картировании с использованием промежуточных маркеров (между локусом *gray* и центromерой) локус *gray* оказался расположенным дальше от центromеры. Чем дальше от центromеры находится изучаемый локус, тем больше вероятность получения двойных кроссоверов, определяемых по выходу родительских дитипов. Поэтому на карте есть точка, дальше которой частота кроссоверных тетрад не увеличивается.

Картирование генов включает 3 основных этапа:

- 1) определение групп сцепления;
- 2) определение порядка расположения маркеров;
- 3) определение расстояния между ними.

При традиционной оценке расстояния между генами используется показатель — *процент рекомбинации*, выражающий общее число мейотических продуктов. Например, при скрещивании $a^+ b^- \times a^- b^+$ расстояние между локусами *a* и *b* рассчитывается как процент $a^+ b^- + a^- b^+$ рекомбинантных генотипов (продуктов).

Процент рекомбинации можно рассчитать по формуле:

$$\% \text{ рекомбинации} = \frac{N + \frac{1}{2}T}{T + P + N}.$$

Тетрады *N* являются полностью рекомбинантными ($4/4$), тетрады *T* — наполовину рекомбинантны ($2/4$); ($T + P + N$) — общее число тетрад (асков).

Расстояние между локусами рассчитывается в сантиморганах (сМ):

$$\text{Расстояние} = \frac{50(T + 6N)}{(P + N + T)}.$$

гес-Гены

Показано, что на частоту рекомбинаций оказывают влияние *гес-гены* (название происходит от recombination). Мутанты *гес* чувствительны к УФ, поэтому их отбор легко можно производить с использованием метода реплик после облучения колоний.

Р. Холлидей (R. Holliday, 1967) индуцировал большое количество УФ-чувствительных мутантов у возбудителя головни куку-

рузы *Ustilago maydis*. Он выделил целую серию мутантов — *rec1*, *rec2*, *rec3*, используя метод реплик. Так, *rec2*-мутант, помимо чувствительности к УФ, был дефектен также по мейозу, т.е. в диплоиде, гомозиготном по *rec2*-гену (при скрещивании *rec2* × *rec2*), получали стерильное потомство. Мутантная аллель *rec1* не подавляла мейоз, но значительно влияла на снижение эффективности репарации, при этом увеличивалась доля спонтанных мутаций и происходила потеря сегментов хромосом. Мутант *rec3* был дефектен по вырезанию (удалению) дефектных пиримидиновых димеров и характеризовался повышенной частотой генных конверсий. Двойной мутант *rec1 rec2*, будучи гомозиготным по обоим локусам, был полностью дефектным по митотической внутригенной рекомбинации.

У *Neurospora crassa* также были обнаружены *rec*-гены, влияющие на частоту рекомбинаций в пределах специфических генов и даже целых хромосомных сегментов (D. Catcheside, 1975). При этом контролирующий *rec*-ген не всегда был тесно связан с участком, на частоту рекомбинаций которого он оказывал влияние. Аллель, дающий низкую частоту рекомбинации, доминантен.

Например, рецессивный ген *rec²* *N. crassa* расположен на V хромосоме и контролирует участок сцепления на IV хромосоме, состоящий из следующих маркеров (мутаций ауксотрофности):

pyr3 his5 trp4 leu2.

Аллель *rec²*, дающий низкую частоту рекомбинации, доминантен. В норме частота рекомбинации между локусами *pyr3* и *his5* не превышает 10 %, но в скрещиваниях *rec²* × *rec²* происходило резкое увеличение частоты рекомбинаций в 30—40 раз. Этот же локус *rec²* влиял на внутригенные рекомбинации в пределах локуса *his3*, расположенного на I хромосоме.

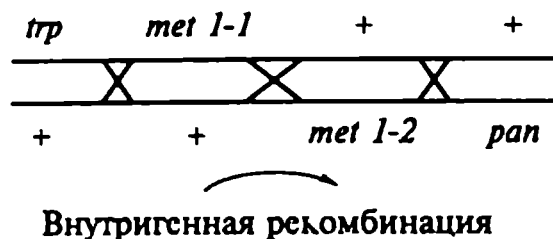
Выделить мутанты, дефектные по рекомбинации, можно по нарушению их способности формировать жизнеспособные мейотические споры. Например, у *Schizosaccharomyces pombe* было выделено много мутантов, неспособных спорулировать, причем блокирование функций могло происходить на различных этапах полового цикла: от слияния клеток до нарушений в I и II мейотическом делениях. Многие *rec*-мутанты влияют на внутригенные рекомбинации, и, как было показано позже, продуктами некоторых *rec*-генов являются белки *рекомбиназы*, участвующие в образовании перекрестов (хиазм) во время кроссинговера (см. далее схему Холлидея).

Внутригенные рекомбинации

Внутригенные рекомбинации по какому-либо локусу можно изучать с использованием мутантов по этому локусу, фланкированному другими маркерами.

Допустим, имеется два ауксотрофных мутанта — *met1-1* и *met1-2* — по метионину у *N. crassa*. Этот локус фланкирован другими локусами — *trp* и *pan* *trp* — потребность в триптофане, *pan* — потребность в пантотенате.

Один родитель является ауксотрофом по метионину и триптофану (*trp met1-1* ++), другой — по метионину и пантотенату (++ *met1-2 pan*). Контроль расщепления будем проводить по фланкирующим маркерам. В зиготе ауксотрофные ядра сливаются и образуют прототроф:



В потомстве при рассеивании аскоспор получились следующие классы рекомбинантов:

+++ +	Прототрофы	— 50 шт.;
<i>trp</i> +++		36 шт.;
+++ <i>pan</i>		9 шт.;
<i>trp</i> + <i>pan</i>		5 шт.

Фланкирующие маркеры реципрокно обмениваются, и все полученные комбинации свидетельствуют в пользу реципрокных обменов по фланкирующим маркерам, т.е. об обычной межлокусной рекомбинации. Интересно то, что во всех случаях наблюдаем восстановление нормального (дикого) генотипа по метиониновой зависимости (++), что свидетельствует о внутрилокусной рекомбинации, причем данные рекомбинации не реципрокные. Так, с помощью двух реципрокно рекомбинирующих фланкирующих маркеров можно обнаружить внутригенные рекомбинанты. Внутригенные рекомбинации есть результат не реципрокных обменов, а так называемой *конверсии генов*.

Конверсия генов

Конверсия гена является биологическим процессом, играющим важную роль и в эволюции живых организмов, и в их онтогенезе. Помимо того, что конверсия гена участвует в гомологической рекомбинации, она является одним из проявлений другого фундаментального генетического процесса — репарации ДНК. В основе конверсии лежит общий механизм — исправление (коррекция) неспаренных (некомплементарных) оснований в реком-

бинационном гетеродуплексе ДНК. Конверсия генов может происходить как в случае законных, так и незаконных рекомбинаций. *Конверсия гена* — это нересципрокная гомологичная рекомбинация, основанная на коррекции неспаренных оснований в рекомбинационном гетеродуплексе.

Отклонения от менделевского расщепления при тетрадном анализе на *N.crassa* Маргарет Митчел в 1955 г. объяснила *конверсией генов*. Работая с пиридоксинзависимыми мутантами, она предположила связь явления конверсии с кроссинговером, однако в отличие от механизма классического кроссинговера внутригенные рекомбинации могут быть нересципрокными. Еще раньше в 1949—1953 гг. это явление описал К. Линдегрен на дрожжах.

Конверсия гена — это явление, когда одна из двух копий какого-либо аллеля замещается (или «конвертируется») экстракопией другого аллеля, т.е. происходит внутригенная рекомбинация, причем нересципрокная в отличие от классического ресципрокного кроссинговера, рассмотренного выше. У грибов конверсия широко изучалась с помощью цветных мутаций, например окраски аскоспор у *Ascobotulus*. Этот гриб удобен для тетрадного генетического анализа, так как способен образовывать большие сумки с крупными аскоспорами, которые можно изолировать прямо на предметном стекле.

Пример. У аскомицетного гриба *A. immersus* с неупорядоченными тетрадами при скрещивании светлых и темных аскоспор получали:

светлый (мутант) × темный (нормальный фенотип) →
→ расщепление не 1 : 1, а 3 : 1,

т.е. в тетраде было 6 мутантных светлых : 2 темные нормальные аскоспоры (ожидаемое менделевское расщепление должно быть 4 : 4 при скрещивании светлых (мутантных) и темных аскоспор дикого типа).

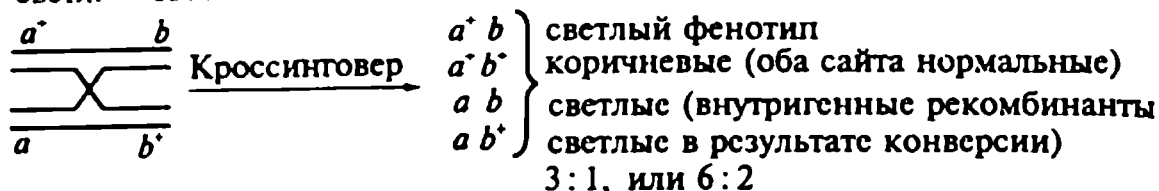
Еще более удивительным оказался вариант получения класса темных аскоспор при скрещивании светлых мутантных родительских генотипов.

Допустим, a и b — два сайта локуса окраски аскоспор: если гетерозиготная клетка $a b / a^+ b^+$ вступает в мейоз, то в норме среди продуктов мейоза оба аллеля гена будут представлены в равном соотношении, т.е. 4 светлые : 4 темные:

$$a b \times a^+ b^+ \rightarrow \left. \begin{array}{l} a b \\ a b \\ a^+ b^+ \\ a^+ b^+ \end{array} \right\} \begin{array}{l} 4 \text{ светлые} : 4 \text{ темные} \\ \text{(менделевское расщепление)} \end{array}$$

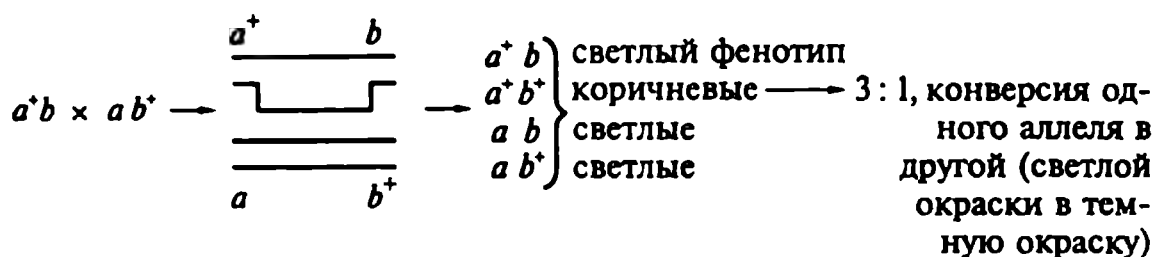
Однако в результате кроссинговера и конверсии (внутри генного локуса) может быть следующая ситуация при скрещивании:

mutant × mutant
светл. × светл.



a и b — мутантные сайты в пределах гена, отвечающего за окраску спор

Позже был предложен механизм конверсии генов: в ходе репликации ДНК происходит *копирование с переменной матрицы*. Оно и приведет к описанному выше расщеплению. Фактически происходит коррекция молекулярной гетерозиготы в результате нереципрочной рекомбинации. Схематично данный процесс можно изобразить следующим образом:



Чтобы показать, является ли данное расщепление результатом конверсии или кроссинговера, нужно провести бэккроссы, т.е. все потомство скрестить с родителями (табл. 8):

$P_1: a b^+ \times P_2: a^+ b$ — оба родителя имеют светлую окраску аскопор (внутрилокусные гетерозиготы)

Таблица 8. Бэккроссы между потомками и их родителями

Родители F1 потомки	$a b^+$ светлые	$a^+ b$ светлые	Генотипы
● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○	— 0/8000* 7/2000 10/3500	— 6/1500 0/10000 0/800	4 темные : 4 светлые (по Менделю) $a b^+$ } Отсутствие одного класса $a^+ b$ } светлых спор — генотипа $a b$ } $a b$ — свидетельствует о кроссинговере
● ● ○ ○ ○ ○ ○ ○	— 0/10000 8/1800 0/11000	— 11/2400 0/6400 0/1400	4 темные : 4 светлые (по Менделю) $a b^+$ } Результат конверсии, так как $a^+ b$ } присутствуют все варианты $a b$ } генотипов аскопор светлой окраски

Примечание. В числителе — число октад, давших расщепление 2:6 (окрашенные и светлые споры), в знаменателе — общее число проанализированных асков

Таким образом, рекомбинанты по маркерам, расположенным на очень близком расстоянии (соизмеримом с геном), образуются за счет конверсии. В этом случае происходит *редупликация со сменой матрицы*. Рекомбинанты по маркерам, расположенным на значительном расстоянии, образуются за счет *реципрокного кроссинговера*.

Какое можно дать объяснение этому явлению? В начале 60-х годов XX в. появилось несколько моделей кроссинговера, которые объединяли представления о конверсии и реципрокной рекомбинации. Одной из таких моделей является *схема Р. Холлидея*, которая постулировала единство реципрокной рекомбинации и конверсии генов. Фактически предположение о том, что при генетической рекомбинации образуются гетеродуплексные ДНК (гибридные ДНК), было независимо высказано двумя учеными, *Н. Whitehouse* и *R. Holliday*, в одно и то же время (публикации 1963—1965 гг.).

По мере накопления данных, особенно данных по мутациям с повышенной чувствительностью к действию мутагенов, была выделена целая серия *мутантов по репарации* (*rad*, DNA repair genes), которые позволили охарактеризовать два основных типа ферментов — *эндонуклеазы* и *лигазы*, участвующих в процессе рекомбинации. Были также описаны гены (и кодируемые ими ферменты), которые фактически влияют на эффективность рекомбинации — это *гес-гены* и белки *рекомбиназы*.

Гипотеза Холлидея (1964) была предложена для грибов. Она была основана на утверждении, что в основе процесса рекомбинации лежит принцип «разрыв — воссоединение» пар гомологичных молекул ДНК, что в дальнейшем было продемонстрировано экспериментально многочисленными работами. Схема Холлидея разработана для мейотического кроссинговера. Напомним, что ядро мейотической клетки в профазе I содержит по 4 гомологичные хроматиды, но в каждом отдельном акте кроссинговера участвуют только две из них — несестринские, от разных гомологичных хромосом (рис. 32).

Рекомбинация начинается с симметричных первичных одноцепочечных разрывов фосфодиэфирных связей ДНК — по одному разрыву в каждой биспирали ДНК (разрыв обеспечивается эндонуклеазой). Разрывы происходят в двух цепях одинаковой полярности (например, 3'-цепи) (рис. 32, а). Холлидей постулировал также, что разрывы возникают не в случайных, а в определенных сайтах ДНК, что впоследствии было подтверждено экспериментально.

Далее от точек первичных разрывов происходит обмен цепями между дуплексами, т. е. концы нитей около разрывов отделяются от комплементарных партнеров и перебрасываются на брешии в гомологичных молекулах ДНК. Образуется перекрест оди-

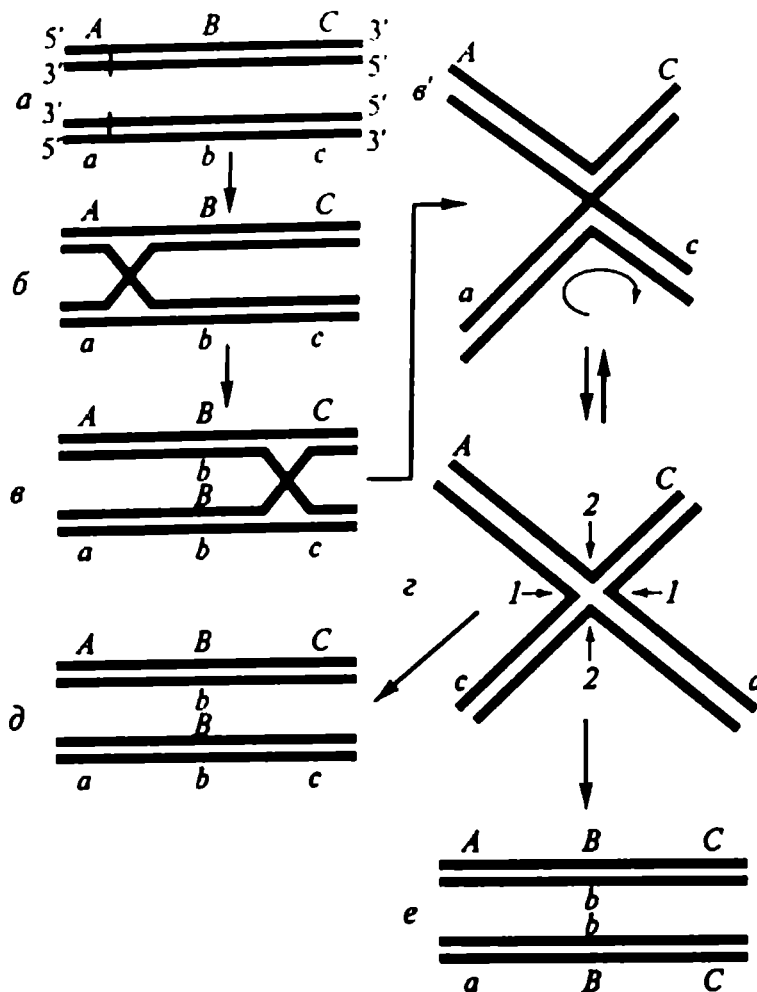


Рис. 32. Схема Холлидея.

Вертикальные черточки указывают места первичных разрывов в цепях ДНК

ночных нитей (полухроматид) и создается крестообразная структура, названная *полухиазмой Холлидея* (the crossed strand Holliday structure) (рис. 32, б). Полухиазма — потому что в обмен вовлечены только две из четырех цепей ДНК (в отличие от полной хиазмы — характерного продукта заверщенного мейотического кроссинговера). Концы переброшенных нитей лигируются с концами нитей реципиентных молекул ДНК.

Затем происходит очень важный процесс перемещения точки перекреста цепей в полухиазме вдоль рекомбинирующих дуплексов — *миграция ветвления* (миграция полухиазмы). Миграция ветвления заключается в следующем: от начальной точки перекреста цепей исходные дуплексы расплетаются, и высвобождающиеся цепи тут же ренатурируют с комплементарными цепями из гомологичных дуплексов, что приводит к образованию гибридных участков ДНК заметной протяженности и последующему удлинению гетеродуплекса B/b (рис. 32, в). На каждом биваленте образуется гетеродуплексный участок ДНК, состоящий из ориги-

нальной цепи и новой, от другого партнера. Именно в удлинении гетеродуплексного участка и заключается *биологический смысл миграции ветвления*, при этом размеры гетеродуплексов могут варьировать от нескольких сот до нескольких тысяч нуклеотидных пар.

После того как гетеродуплекс сформировался, должно произойти разделение сложной разветвленной структуры на гомологи. Этот этап называется *разрешением полухиазмы*. Для разрешения необходимы еще два дополнительных разрыва цепей: вторичные разрывы завершают обмен цепями. Но прежде полухиазма претерпевает *изомеризацию*, в ходе которой ее структура несколько изменяется за счет теплового движения молекул. Потом совершается один поворот на 180° любой пары дуплексных плеч (на рис. 32, *в* — нижней пары). Далее происходят два вторичных разрыва одинаковой полярности: 2-2 — в нитях, претерпевших обмен, или 1-1 — в интактных нитях, что приводит к образованию двух типов рекомбинантных хроматид (рис. 32, *г, д, е*): 1. Если разрыв происходит в плоскости 2-2 (в рекомбинантных хроматидах), то хроматиды будут содержать внутренний гетеродуплекс *B/b*, а фланговые маркеры *A* и *C* не обмениваются и остаются нереконбинантными (не отличаются от исходных); такая картина наблюдается в случае «без кроссинговера». 2. Если разрыв происходит в плоскости 1-1, то в интактных нитях образуются рекомбинантные хроматиды второго типа — кроссоверные, которые также содержат внутренний гетеродуплекс *B/b*, но в то же время обмениваются и участки по обе стороны от него (т.е. обмениваются также и фланги). Таким образом, происходит замена дальнейшего протяжения нити ДНК, т.е. кроссинговер затрагивает полную хиазму, в результате чего образуются гетеродуплексные нити по всей длине цепи ДНК. Конверсия локуса *B* сопровождается реципрокным обменом фланговых маркеров *A* и *C*, т.е. имеет место как *кроссинговер*, так и *конверсия гена*. Обе ситуации равновероятны. Таким образом, схема Холлидея демонстрирует единство процессов конверсии и кроссинговера при гомологичной рекомбинации.

От исходных молекул в рекомбинационный гетеродуплекс могут войти разные аллели, и тогда в нем возникнут неспаренные основания, т.е. произойдут нарушения комплементации нуклеотидов. В этой ситуации начинают работать *ферменты репарации*, производящие коррекцию неспаренных оснований в гетеродуплексе. Они удаляют неспаренное основание в одной цепи ДНК и достраивают образующуюся брешь по матрице другого аллеля в комплементарной цепи, тем самым *конвертируя* (превращая) один аллель в другой (происходит конверсия). Репарация может происходить в обоих направлениях. Действие ферментов репарации обеспечивает молекулярную точность кроссинговера.

Несколько позже М. Мезельсон и К. Рэддинг (1975) частично изменили схему кроссинговера по Холлидею. Эту модель принимают и в настоящее время. Она представлена следующими этапами (рис. 33):

1. На начальной стадии рекомбинации гомологичные участки парных молекул ДНК сближаются и гетеродуплексный участок образуется не на двух, а только на одной молекуле ДНК (в одном из двух бивалентов); при этом происходит одноцепочечный разрыв лишь в одной молекуле ДНК.

2. Вслед за разрывом один конец нити вытесняется другим ее концом, который наращивается *ДНК-полимеразой* (волнистая линия на рисунке), т.е. происходит *вытеснение* правого участка нити ее левым растущим участком (фактически *миграция ветвления*). Миграция ветвей направлена от 3'- к 5'-концу нити реципиентной ДНК.

3. Вытесненный конец в свою очередь спаривается со второй молекулой ДНК (другой биспиралью), вытесняя там участок од-

ной из ее нитей, в результате чего образуется *D-петля замещения* (*D-loop, displacement*). D-петля расщепляется *RecBC-нуклеазой* на стадии *ассимиляции*. Таким образом, видно, что гетеродуплекс образуется только на одной из рекомбинирующих молекул ДНК.

4. Далее следует *изомеризация* — поворот флангов рекомбинирующих молекул ДНК друг относительно друга на 180°, что превращает од-нонитевой перекрест в двухнитевой, и фланги оказываются тоже рекомбинировавшими.

5. После этого перекрест может мигрировать налево или направо, в результате чего дополнительно образуются, или «растут», *гетеродуплексные участки* на обеих молекулах ДНК. *Эндонуклеазы* и *лигазы* завершают рекомбинацию. В этой схеме также наблюдается единство процессов конверсии и рекомбинации.

Таким образом, рекомбинация — это сложный многоступенчатый процесс, требующий расплетания молекул ДНК, разрыва нуклеотид-

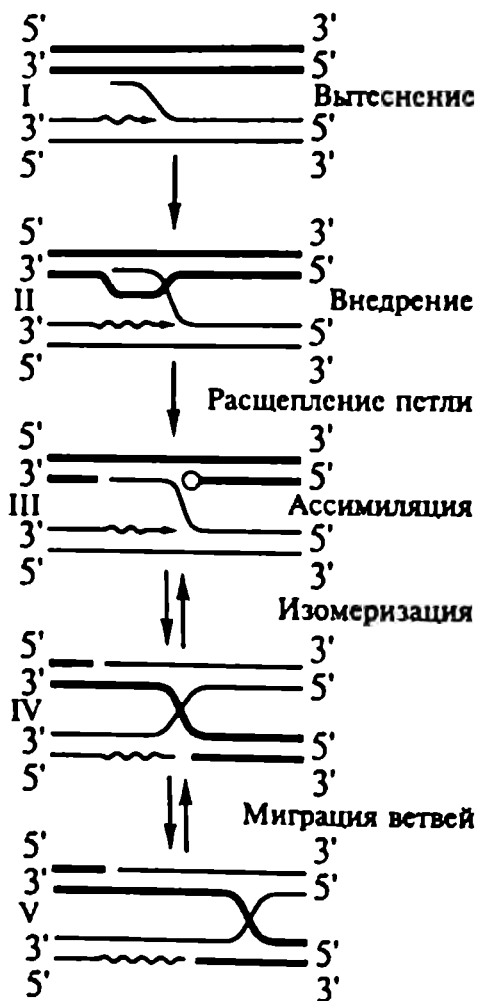


Рис. 33. Мейотическая рекомбинация (по М. Мезельсону и К. Рэддингу)

ных цепей, внедрения цепей ДНК, миграции ветвления, последующего разрезания цепей и устранения полухиазм. Большинство имеющихся сведений о ферментативном аппарате, обеспечивающем столь сложно устроенный механизм, получено при изучении обмена генов у *E. coli*, хотя у данного прокариотического организма нет типичного для эукариот мейоза, а половое воспроизведение представлено конъюгацией.

Ключевые ферменты, обеспечивающие процесс генетической рекомбинации:

— *эндонуклеаза* — обеспечивает одноцепочечные разрывы в молекуле ДНК;

— *экзонуклеаза* — «откусывает» высвобождающиеся одноцепочечные концы;

— *репаративная ДНК-полимераза* — достраивает одноцепочечные концы;

— *лигаза* — сшивает концы молекул ДНК.

Все эти ферменты известны, выделены и изучены в экспериментах, и их участие в процессе рекомбинации показано экспериментально.

Основные закономерности процесса конверсии

- Конверсия равнонаправленна. Выбор удаляемого основания из двух неспаренных в рекомбинационном гетеродуплексе случаен, поэтому тетрады $3B : 1b$ и $1B : 3b$ равновероятны.

- Конверсия полярна. Полярность проявляется в том, что частоты конверсии разных аллелей одного гена закономерно снижаются начиная с определенной точки; чаще всего наблюдаем градиент от одного конца гена к другому. У дрожжей они обычно варьируют от 18 % до долей процента. Поскольку частота конверсии аллеля зависит от вероятности его попадания в гетеродуплекс, то полярность указывает на наличие в хромосомах фиксированных сайтов, в которых инициируется рекомбинация. Их называют *горячими точками рекомбинации*.

- Конверсия может сопровождаться (а может и не сопровождаться) кроссинговером по внешним фланкирующим маркерам, и эти случаи равновероятны. Это правило, однако, не распространяется на соматические клетки грибов.

Описание конверсии генов было бы неполным без упоминания гипотезы А.Карпентер о роли и месте конверсии в мейозе. Согласно гипотезе, в мейозе конверсия и кроссинговер — это отдельные процессы, разобщенные во времени и играющие разные роли. Функционирование аппаратов конверсии и кроссинговера связано с особыми уплотнениями в местах контактов ДНК

и синаптонемного комплекса, называемыми *рекомбинационными узелками*. Последние бывают двух типов — ранние и поздние. Ранние рекомбинационные узелки связаны с конверсией, поздние (их несколько меньше) — с кроссинговером. По времени появления в мейозе узелки совпадают с приписываемыми им процессами. Конверсия идет в зигонеме или даже в лептонеме. Роль конверсии заключается в проверке гомологии между хромосомами после их временного синапсиса. Проверка осуществляется прямым сравнением последовательностей ДНК через попытку сформировать гетеродуплекс.

При наличии гомологии ситуация стабилизируется при участии *синаптонемного комплекса*. При отсутствии гомологии хромосомы расходятся для новых попыток поиска гомологии. События кроссинговера происходят в пахинеме и приводят к формированию хиазм, которые необходимы для правильного расхождения гомологов в анафазе I.

Эта гипотеза получила убедительные, хотя и косвенные подтверждения, полученные при изучении мутантов, дефектных по мейозу. Например, у дрожжей мутант *mer1* образует нежизнеспособные аскоспоры (что указывает на нарушение мейоза) и дефектен по обоим типам мейотической рекомбинации и спариванию гомологичных хромосом.

Если в клетку мутанта *mer1* ввести на плазмиде большое число копий другого гена — *MER2*, то у полученного гибридного штамма одновременно полностью восстанавливается способность к конверсии и спариванию хромосом, но кроссинговер и жизнеспособность аскоспор не восстанавливаются.

Эти данные указывают на роль конверсии в поиске гомологии и на то, что синапсис — прямое следствие поиска гомологии. В то же время они свидетельствуют о роли кроссинговера в расхождении хромосом, поскольку нерасхождение хромосом в результате подавления кроссинговера приводит к утрате жизнеспособности аскоспор.

Важно еще раз подчеркнуть взаимосвязь между конверсией и кроссинговером. С одной стороны, из рассмотренной модели рекомбинации следует, что конверсия является этапом общего процесса кроссинговера. С другой стороны, накоплено большое количество данных о том, что многие мутации рекомбинационных генов (*rec*) по-разному влияют на оба типа рекомбинации: одни избирательно подавляют конверсию, другие — кроссинговер. В то же время в одних случаях рекомбинация сводится преимущественно к кроссингверу, в других — к конверсии. Таким образом, конверсия и кроссингвер часто выступают как независимые явления. Но насколько независимые? — на этот вопрос ответа пока нет. Оба процесса базируются на общих моделях.

Постмейотическая сегрегация

В ходе кроссинговера генов, как было показано в схемах, образуются некие участки *молекулярной гетерозиготности* (гетеродуплексные молекулы ДНК, или гетерозиготные ДНК-дуплексы). При последующем митотическом делении молекулярная гетерозиготность исчезает: благодаря полуконсервативной редупликации ДНК каждая из вновь синтезированных молекул будет нести (в соответствующих участках) лишь по одному из двух альтернативных маркеров, т.е. фактически происходит пост-мейотическое расщепление аллелей. Таким образом, если происходит репарация, то при *постмейотической сегрегации* (*PMS — postmeiotic segregation*), т.е. в митозе, следующем за мейозом, хотя и будет наблюдаться в некоторых сумках соотношение аскоспор — 4 темные : 4 светлые, но расположение их в сумке будет абберантным (см. схему ниже). Постмейотическая сегрегация фактически служит доказательством того, что генная конверсия произошла.

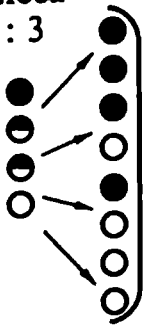
Впервые постмейотическую сегрегацию в митотическом делении, следующим за мейотическим, продемонстрировали Y. Kitani, L. Olive (1967) у 8-спорового аскомицета *Sordaria fimicola*. При скрещивании культур, полученных из спор дикого типа (темные), с мутантными (светлыми) колониями были обнаружены следующие *типы расщепления* в сумках:

- а) 4 темн. : 4 светл.; б) 6 темн. : 2 светл.; в) 2 темн. : 6 светл.;
г) 3 темн. : 5 светл.; д) 5 темн. : 3 светл.; е) аббер. 4 темн. : 4 светл.

Расщепления б и в есть результат конверсии генов; расщепление а — это норма, в то время как расщепление е есть результат постмейотической сегрегации, представленной на схеме:

Продукты
мейоза

1 : 3

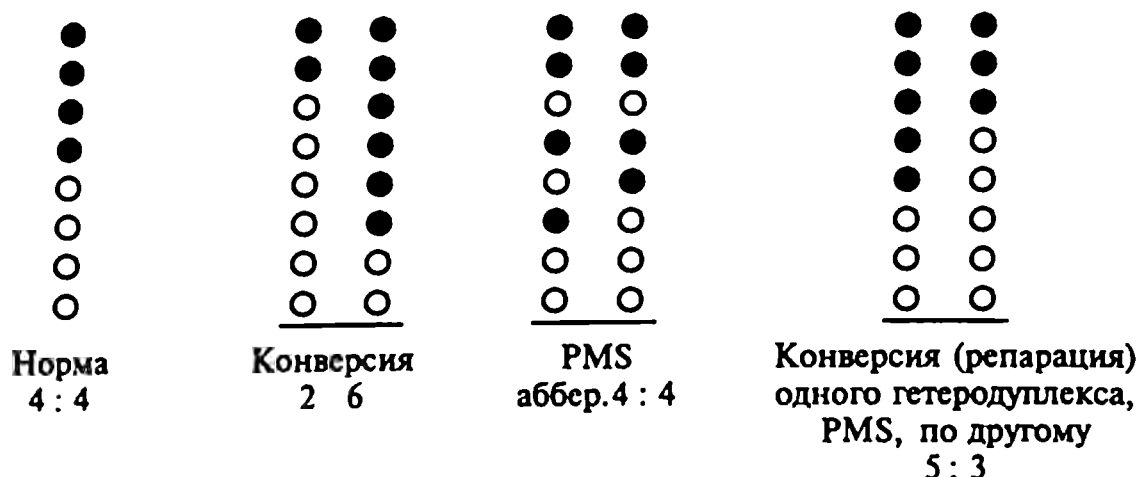


Продукты митоза → расщепление 4 темн. : 4 светл.,
но с абберантным расположением аскоспор;
3 темн. : 1 светл. : 1 темн. : 3 светл.

Таким образом, молекулярная гетерозиготность (на схеме ⊕) по маркеру окраски спор в митозе исчезает.

Подобная сегрегация аллелей в митозе, следующим за мейозом, показывает, что хроматиды могут быть *гибридными* (т.е. фактически это *гетеродуплексные* участки, содержащие некомплементарные нуклеотидные пары, в сайте внутренней гетерозиготности изучаемого аллеля).

Другие возможные варианты расщеплений маркера окраски спор в сумках:



Постмейотическая сегрегация еще раз доказывает происходящие в ходе мейотической рекомбинации процессы репарации, при которых образуются внутренние (в пределах какого-либо аллеля) участки с неспаренными нуклеотидами, дающими при расщеплении в митозе различные аллели, и может происходить конвертирование одного аллеля в другой.

Пример. Частоты генной конверсии и постмейотической сегрегации в скрещиваниях

дикий тип × мутантный

для некоторых аскомицетов представлены в табл. 9.

Таблица 9. Частота постмейотической сегрегации признаков (PMS) у аскомицетов

Ген	Всего сумок	Расщепление в сумках					% сумок (неменделевские расщепления)	PMS (% от всех неменделевских расщеплений)
		6 : 2	2 : 6	5 : 3	3 : 5	аббер. 4 : 4		
<i>Sordaria fimicola</i> (Y. Kitani, L. Olive, 1967)								
<i>gray gl</i>	48 710	31	6	35	14	13	0.20	61
<i>h₂</i>	45 890	7	5	26	23	35	0.22	92
<i>Ascobolus immersus</i> (N. Paquette, 1978)								
<i>A₄</i>	13 492	58	80	573	670	1054	17.0	94

Ферментативный аппарат, обеспечивающий конверсию и рекомбинацию

Сначала у прокариот, а потом и эукариот были выделены белки, обеспечивающие процессы репарации — процессы исправления пар некомплементарных оснований: *MutS* и *MutL*. Эукариотические гомологи бактериальных белков *MutL* называют *MLH* (*MutL homolog*), или *PMS* (*post meiotic segregation*), а гомологи прокариотического *MutS* — *MSH*-белки (*MutS homolog*). Их удалось выявить по гомологиям с бактериальными. Как и у бактерий, эти белки могут участвовать и в исправлении ошибок репликации, и в конверсии. Главное доказательство участия каждого белка в конверсии — повышение частоты постмейотической сегрегации у мутанта по соответствующему гену. Причем эукариотические белки взаимодействуют с неспаренными основаниями по той же схеме, что и их бактериальные гомологи, но они проявляют большее разнообразие и представлены семействами. У дрожжей обнаружены три гомолога *MutL* (*MLH1*, *MLH2*, *MLH3*) и шесть гомологов *MutS* (от *MSH1* до *MSH6*). Однако не все белки заняты в конверсии. Например, *MSH4* и *MSH5* участвуют в мейотическом реципрокном кроссинговере, но не в конверсии.

Позже было показано, что для успешной гомологичной рекомбинации необходим нормально функционирующий ген *recA* (A. Clark, 1975). В общей рекомбинации участвуют два специфических фермента и еще несколько ферментов, катализирующих процессы репликации и репарации ДНК. Для *E. coli* было экспериментально показано, что фермент RecA обеспечивает обмен одиночными цепями и соединяется с местом одонитевого разрыва и характеризуется способностью расплетать биспираль ДНК. Функция этого фермента заключается в перебрасывании одонитевого участка ДНК на сверхспирализованную двухнитчатую ДНК (при образовании D-петли замещения). Белок RecA обладает также протеолитической субстратной специфичностью. RecA-зависимое внедрение одноцепочечной ДНК в дуплекс — первый этап рекомбинационного процесса. Белок RecA фактически инициирует рекомбинационный процесс. Однако есть и другие белки, способные вызывать рекомбинационное соединение молекул ДНК по участкам гомологий, например *ДНК-синаптаза*. Очищенный фермент способен соединять между собой биспиральные ДНК или биспиральные ДНК с гомологичными одонитевыми ДНК подобно белку RecA. Второй фермент *E. coli*, состоящий из трех отдельных субъединиц и поэтому называемый *RecBCD-нуклеазой*, обладает эндо- и экзонуклеазной, а также хеликазной активностями. Фермент RecBCD-нуклеаза индуцирует разрывы в дуплексной ДНК и благодаря присущей ему хеликазной активности вместе с RecA инициирует рекомбинационный процесс. Идентифициро-

ван также фермент, разрезающий узлы в структурах Холлидея; при его участии образуются липкие концы, соединяемые лигазой. В гомологичной рекомбинации участвуют также хеликазы и белки, связывающиеся с одноцепочечными ДНК (SSB — *single strand binding*). Они необходимы для обеспечения процесса миграции ветвления. Белки SSB также стабилизируют однонитевый участок ДНК. Как известно, перемещению цепей во время миграции ветвления способствует ДНК-полимераза I PolI, а в воссоединении разорванных цепей участвует *ДНК-лигаза*. Для снятия топологических ограничений при раскручивании спирали и для распутывания перекрученных структур, по-видимому, приходят на помощь топоизомераза типа I и гиразы. *ДНК-хеликаза* (DNA helicase) и *гираза* способны расплетать биспираль при наличии однонитевого участка ДНК. Хеликазы участвуют также в замещении нуклеотидов во время коррекции гетеродуплексных участков (репарации ДНК).

Помимо гипотезы Холлидея существуют и другие. Например, у дрожжей *S. cerevisiae* никогда не наблюдали однонитевые разрывы. Дж. Жостак с соавт. в 1983 г. предложили модель двухнитевых разрывов. Исследователи обнаружили специфические двухцепочечные разрывы в генах *arg4* и *his4*, возникающие только в мейозе. Согласно этой модели, сначала эндонуклеаза делает двухнитевой разрыв, а 5'3'-экзонуклеаза делает брешь, в результате чего образуются однонитевые рекомбиногенные 3'-концы, куда и садится фермент *RAD52* (*S. cerevisiae*) (рис. 34). Этот фермент синтезирует D-петлю замещения, происходит миграция ветвления плюс репаративный синтез ДНК, в результате чего брешь замещается.

Изучение мейотических мутаций позволило выделить *rad*-гены репарации ДНК у *Coprinus* и *S. cerevisiae* (C. Zolan et al., 1995). У дрожжей обнаружены белки Spo11 и Rad50-Mre11-комплекс, которые играют существенную роль на ранних стадиях мейотической рекомбинации, а именно, в двухнитевых разрывах молекул ДНК, что и инициирует мейотическую рекомбинацию. Эти же белки описаны и у *Coprinus*. У дрожжей по крайней мере 11 белков требуется для инициации мейотической рекомбинации, и несколько из них хорошо охарактеризованы. Spo11 — это белок, подобный топоизомеразе II, который образует запрограммированные двухнитевые разрывы ДНК (*double strand breaks* = *DSBs*). Мутации по гену *rad50* блокируют формирование точных двухнитевых разрывов ДНК (*DSBs*), которые происходят во время зигонемы профазы I. Rad51-белок, как и его прокариотический гомолог RecA, обладает АТФ-зависимой активностью в обмене цепями. Эукариотические гомологи RecA-белка были обнаружены у многих видов.

Значение конверсии как одного из механизмов законной и незаконной рекомбинации очень велико. Показано, что кроссинговер может происходить (хотя и редко) в условиях, когда обра-

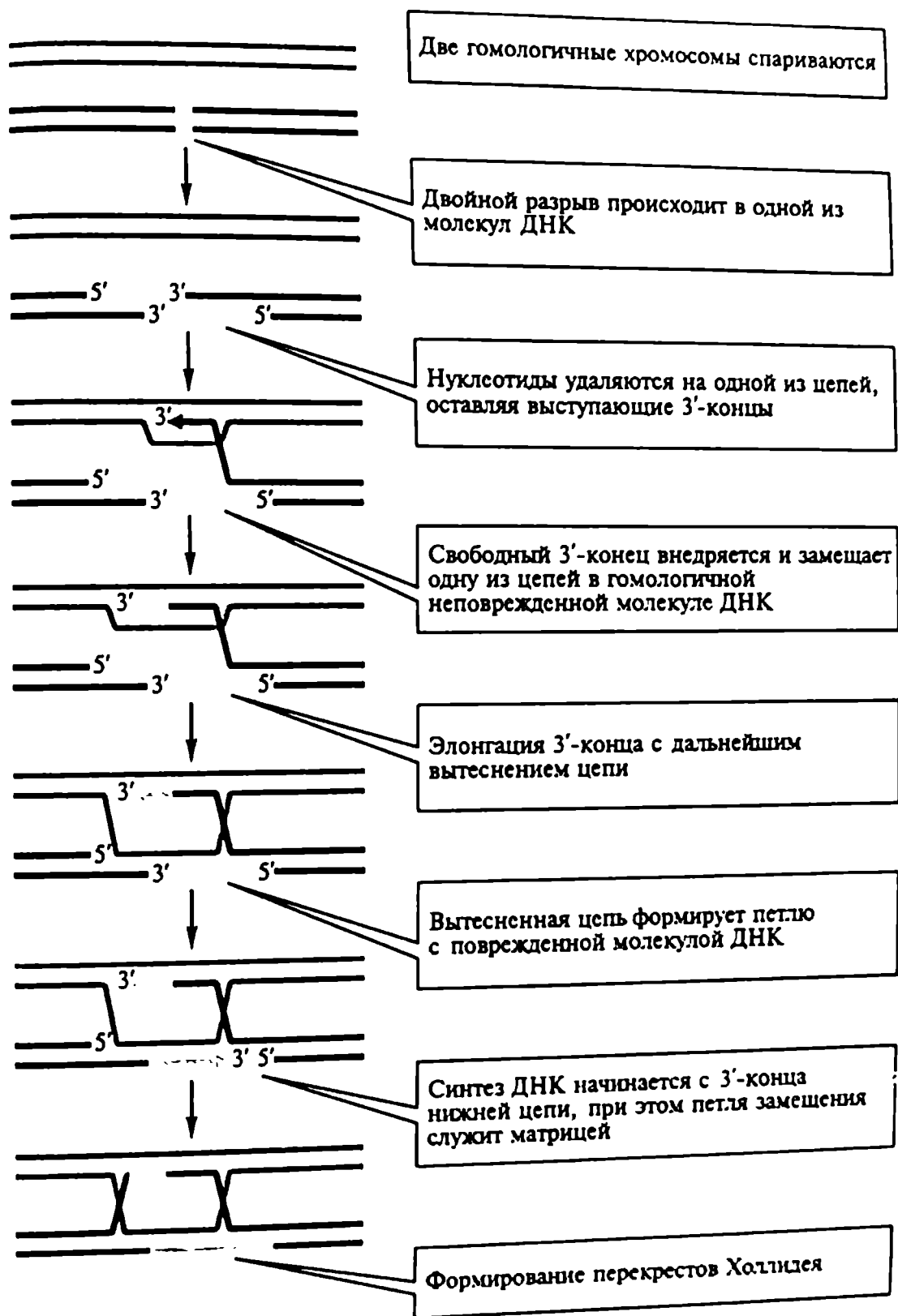


Рис. 34. Мейотическая рекомбинация с двухнитевыми разрывами у дрожжей (по механизму репарации двухцепочечных разрывов)

зование *синаптонемного комплекса* подавлено в клетках дрожжей, начавших готовиться к мейозу. В этих же условиях весьма активно происходит генная конверсия (репарация в гетеродуплексном участке ДНК, образовавшемся в результате переброски конца нити с одной хроматиды на другую). Считается, что синаптонемный комплекс стимулирует изомеризацию рекомбинирующих хроматид, но мало влияет на сближение гомологов и на первую стадию рекомбинации — образование структур Холлидея или Мезелсона. Доказано образование молекулярных структур такого типа и рекомбинаций на уровне ДНК в половых и соматических клетках. Обмен одностранными участками гомологичных ДНК не нуждается в синаптонемном комплексе. Можно заключить, что потенциальная способность к генетической рекомбинации является врожденным свойством любых репродуцирующихся клеток — не только половых, но и соматических. Лишь в дополнение к этому выработаны специальные аппараты, в том числе синаптонемный комплекс, обеспечивающий многократное повышение частоты межгенных обменов в клетках полового пути во время мейоза. Таким образом, во всех размножающихся клетках эукариот есть все условия для генетических рекомбинаций. То, что они действительно происходят, доказывают данные о соматическом (*митотическом*) кроссинговере.

Митотическая рекомбинация

Отдельные ядра в мультикариотических клетках грибов могут сливаться. Если сливаются генетически различные ядра, возникают гетерозиготные диплоиды. Образование гетерозиготных диплоидов у гетерокарионов *Aspergillus nidulans* впервые наблюдал в 1952 г. английский миколог Дж. Ропер. Гены, находящиеся в диплоидных ядрах, в процессе митозов могут рекомбинировать вследствие трех явлений: гаплоидизации, нерасхождения хромосом и митотического кроссинговера. Изучение этих процессов позволило использовать их для генетического анализа, что особенно важно для лишенных полового процесса и, следовательно, мейотической рекомбинации несовершенных грибов. Рекомбинация при митозе, в отличие от мейотической, названа Г. Понтекорво *парасексуальным процессом*. Благодаря работам Дж. Ропера, Г. Понтекорво, Э. Кефер и других исследователей наиболее детально парасексуальный процесс был изучен у *Aspergillus nidulans*.

Этапы анализа парасексуального процесса следующие:

- 1) получение гетерокарионов;
- 2) получение гетерозиготных диплоидов;
- 3) выделение и анализ гаплоидных сегрегантов;
- 4) выделение и анализ диплоидных сегрегантов.

Получение гетерокарионов

Для получения гетерокарионов, как правило, используют морфологические или биохимические маркеры. Последние дают возможность автоматически выделять гетерокарионы на селективных средах. Обычно используют ауксотрофные мутации и мутации устойчивости к антибиотикам. В первом случае смесь двух ауксотрофных мутантов (например, *met* и *arg*) высевает на полноценную жидкую или плотную среду с тем, чтобы образовалось переплетение гиф и появились возможные анастомозы, а затем выросший мицелий частями переносят на минимальную среду, на которой каждый мутант в отдельности расти не может. Вследствие комплементации гетерокариотические участки мицелия дадут на минимальной среде рост в виде секторов. При использовании мутантов, резистентных к антибиотическим веществам, смесь спор таких мутантов высевает на среду, лишенную этих ингибиторов, а затем переносят на среду, содержащую оба токсические компонента. Такой метод выделения гетерокарионов может быть успешен лишь в том случае, если гены резистентности доминантны. При наличии рецессивных генов устойчивости в гетерокарионе доминирует чувствительность и роста на двойной среде не будет. Удобно выделять гетерокариотические сектора, если в дополнение к биохимическим штаммы имеют морфологические маркеры. У *A. nidulans* получены мутации, изменяющие окраску конидий: *w* (white) — белые, *y* (yellow) — желтые, *fw* (fawn) — желто-коричневые и др. При использовании в качестве одного или обоих партнеров таких мутантов гетерокариотичные сектора легко визуализировать по мозаичной окраске, возникающей вследствие расщепления гетерокарионов при конидиогенезе и образовании разноокрашенных цепочек монокариотических конидий. Поэтому отсеивать гетерокарионы для дальнейших исследований необходимо с растущего края сектора, имеющего много вегетативных гиф и мало конидий.

Получение диплоидов

Диплоиды в соматических клетках теоретически могут возникать вследствие трех событий: 1) потери мейоза, при котором нормальное для цикла развития данного гриба редукционное деление не происходит и ядра в вегетативных клетках остаются диплоидными (у *A. nidulans* диплоидны 0,1 % аскоспор); 2) нарушений в процессе митозов (удвоение хромосом без деления ядер, как это наблюдается при обработке клеток алкалоидом колхицином); 3) кариогамии гаплоидных ядер в вегетативных клетках. Последнее событие детально исследовано экспериментально бла-

годаря разработанному Дж. Ропером методу селективного выделения гетерозиготных диплоидов. Для этого собирают конидии с колоний гетерокарионов, полученных как описано выше, отфильтровывают их от обрывков мицелия и высевают на минимальную среду (в случае работы с ауксотрофами) или на среду с двумя ингибиторами роста (при работе с резистентными мутантами). Поскольку конидии монокариотичны, их ростки погибнут на таких средах или дадут очень скудный рост. На этом фоне проростки конидий, имеющих гетерозиготные диплоидные ядра, сформируют крупные темно-зеленые колонии.

Специальные методы выделения диплоидов разработаны Р. Холлидеем для головневых грибов, в жизненном цикле которых гаплоидная стадия облигатно сапротрофна, а в гетерокариотичном (дикариотичном) состоянии грибы могут развиваться только в тканях восприимчивых растений (облигатные паразиты). Однако иногда удается выделить монокариотичные штаммы, которые наряду с хорошим ростом *in vitro* способны заражать растения. У таких (слабопатогенных) штаммов ядра диплоидны. Для их селективного выделения получают ауксотрофы по разным факторам роста у скрещивающихся изолятов (+ и -), и их смесью заражают растения. Кусочки зараженной ткани помещают на минимальную агаризованную среду. Исходные гаплоиды не могут развиваться на ней, так как они ауксотрофы, дикариотический мицелий образует очень слабый рост, на фоне которого можно выделить хорошо развитые колонии гетерозиготных диплоидов.

Частота диплоидизации (или, правильнее, число диплоидных конидий среди одноядерных гаплоидных) очень низка и колеблется в пределах 10^{-6} — 10^{-8} . Частоту выделения диплоидов можно повысить обработкой парами камфоры или УФ-облучением. Камфора повышает выход диплоидов в 10—1000 раз, а УФ-лучи — до 10^5 раз. В обоих случаях это обусловлено как повышением частоты кариогамии, так и селективной (более высокой) гибелью гаплоидных клеток под действием обработок.

Для идентификации выделенных диплоидов можно использовать ряд критериев. Их отличия от исходных гаплоидов следующие.

- Фенотип. Например, мутанты *A. nidulans*, имеющие гены w^+ y , образуют желтые колонии, а гены w y^+ — белые. Гетерокарионы имеют мозаичную окраску, а гетерозиготные диплоиды (w/w^+ y/y^+) — зеленую. Диплоиды по двум разным ауксотрофным мутациям прототрофны и т. д.

- Морфология колонии и скорость роста также могут быть отличительными признаками.

- Чувствительность к мутагенным факторам — ионизирующему и УФ-облучениям — у диплоидных клеток ниже, чем у гаплоидных, ибо неповрежденные гены компенсируют повреждение их аллелей.

- Мутабельность — частота мутаций у гаплоидных клеток по тем же причинам выше, чем у диплоидных, рецессивные мутации которых будут замаскированы доминантными аллелями.

- Для фитопатогенных грибов — патогенность, которая у диплоидов может отличаться от гаплоидов.

- Для грибов, имеющих разные типы спаривания, — скрещивание с исходным штаммами. Например, у сахаромикетных дрожжей диплоид a/α не скрещивается ни с a , ни с α .

- Размер клетки: диаметр конидий диплоидов *A. nidulans* в 1,27 раз больше, чем гаплоидов, *A. niger* — в 1,21 раза больше, *Fusarium oxysporum* — в 1,23 раза.

- Число ядер на клетку: в многоядерных конидиях и вегетативных клетках число диплоидных ядер меньше, чем гаплоидных (сохранение ядерно-плазменных отношений).

- Число хромосом. К сожалению, этот, наиболее точный, критерий можно использовать только для мейотических ядер. Мелкие хромосомы и их неупорядочное положение в метафазе митоза не позволяют провести точные подсчеты.

- Размер ядер в ряде случаев позволяет судить о пloidности.

- Количественное содержание ДНК на ядро. С помощью специфических красителей, связывающихся с ядерным материалом (включая люминисцирующие в УФ-свете), можно проводить цитофотометрию и определять интенсивность окраски.

Необходимо отметить, что какой-либо один критерий не дает уверенности в диплоидности выделенного штамма. Требуется комплексное исследование. Кроме того, все критерии не позволяют отличить диплоид от анеуплоида.

Соматические диплоиды были выделены и из природных популяций некоторых грибов (например, *A. niger*). У *Ustilago maydis* 0,25—0,4 % телиоспор, выделенных из пораженных початков кукурузы, были слабопатогенными диплоидами. Природный вид *Verticillium longisporum* с крупными конидиями оказался диплоидным вариантом *V. albo-atrum*.

Генетический и физиологический контроль кариогамии не известен. У базидиомицетов клетки длительное время содержат по два несестринских ядра (гаплоидные гетерокариотические гетерокарионы), и только в определенной стадии жизненного цикла происходит массовое слияние ядер, в то время как в других стадиях частота кариогамии составляет 10^{-6} — 10^{-8} . Дж. Рейпер и Г. Колтин выделили у базидиомицета *Schizophyllum commune* мутацию *dik*, которая подавляла стадию дикариона и приводила к слиянию ядер непосредственно вслед за плазмогамией. Авторы полагают, что в нормальных ядрах имеются гены, осуществляющие негативный контроль кариогамии. В базидиях эти гены перестают транскрибироваться и происходит массовая кариогамия. У осеннего опенка *Armillaria mellea* мутация *dik* становится нормой, по-

этому все вегетативные клетки одноядерны, а ядра диплоидны. У дрожжей, наоборот, описана мутация *kar1*, при которой ядра в конъюгировавших клетках не сливаются, так что клетки становятся не диплоидными, а дикариотичными.

Соматическая рекомбинация

Хотя гетерозиготные диплоиды в отличие от гетерокарионов стабильны, из них могут выщепляться сегреганты вследствие перессортировки целых хромосом или митотического кроссинговера. Выделение сегрегантов можно проводить несколькими путями:

- **Визуальная селекция.** У *A. nidulans* из зеленых колоний гетерозиготных диплоидов могут выщепляться секторы белого или желтого цвета. Мутанты дрожжей, аксотрофные по аденину, образуют красные секторы в белых колониях гетерозиготного диплоида *ad2/ad2**

- **Устойчивость к лекарственным веществам.** Если ген устойчивости рецессивен, то гетерозиготный диплоид будет чувствительным и неспособным расти на среде с ингибитором роста, тогда устойчивые сегреганты можно получать автоматически на средах с ингибиторами. У *A. nidulans* таковы гены устойчивости к акрифлавину и пара-фторфенилаланину. Если устойчивость неполностью доминантна, то устойчивые сегреганты будут расти в присутствии более высокой концентрации ингибитора, чем гетерозиготный диплоид, и на таких средах их можно выделять автоматически.

- **Рецессивная супрессия.** Диплоид, гомозиготный по ауксотрофной мутации и одновременно гетерозиготный по рецессивному супрессору, не растет на минимальной среде (вследствие ауксотрофности). Сегреганты, гомозиготные по супрессору, позволят расти на минимальной среде вследствие супрессии ауксотрофности. У *A. nidulans* на правом плече I хромосомы расположен ген *ad20* (потребность в аденине), а на левом — его супрессор — *su ad20*:

<u>su</u>	<u>ad 20</u>	Данный гаплоидный штамм способен расти на среде без аденина.
su	ad 20	
+	ad 20	Диплоид не способен расти на среде без аденина, так как локус <i>su</i> находится в гетерозиготном состоянии <i>su/su*</i> и маскируется доминантным аллелем.

- **Рекомбинация между сайтами одного цистрона.** Гетерозиготный диплоид с *транс*-положением сайтов мутантного гена (*m1m2*/m1*m2*) не растет на минимальной среде, так как мутации одного гена не комплементируются. Сегрегант *m1m2/m1*m2** (*цис*-положение) даст рост.

Выщепление сегрегантов происходит вследствие одного из трех событий: гаплоидизации, нерасхождения хромосом при митозе и митотического кроссинговера.

Гаплоидизация

Определенная доля сегрегантов содержит гаплоидные ядра. Как показала Э. Кэфер, процесс гаплоидизации происходит в течение ряда последовательных митозов через серию анеуплоидов, т. е. постепенной потери одного из наборов хромосом. Причиной анеуплоидии может быть анафазное отставание отдельных хромосом при движении к полюсам вследствие недостаточного натяжения нитей веретена в средней анафазе. При этом возникают моносомы ($2n - 1$). Анеуплоидное состояние нестабильно, в последующих митозах ядро или восстанавливает диплоидный набор, или продолжает терять хромосомы одного набора, что приводит к гаплоидизации. При этом потери хромосом того или другого партнера происходят случайно, вследствие чего возможны пересортировка хромосом между гаплоидными ядрами и, следовательно, сегрегация признаков. В результате гаплоидизации возникают два

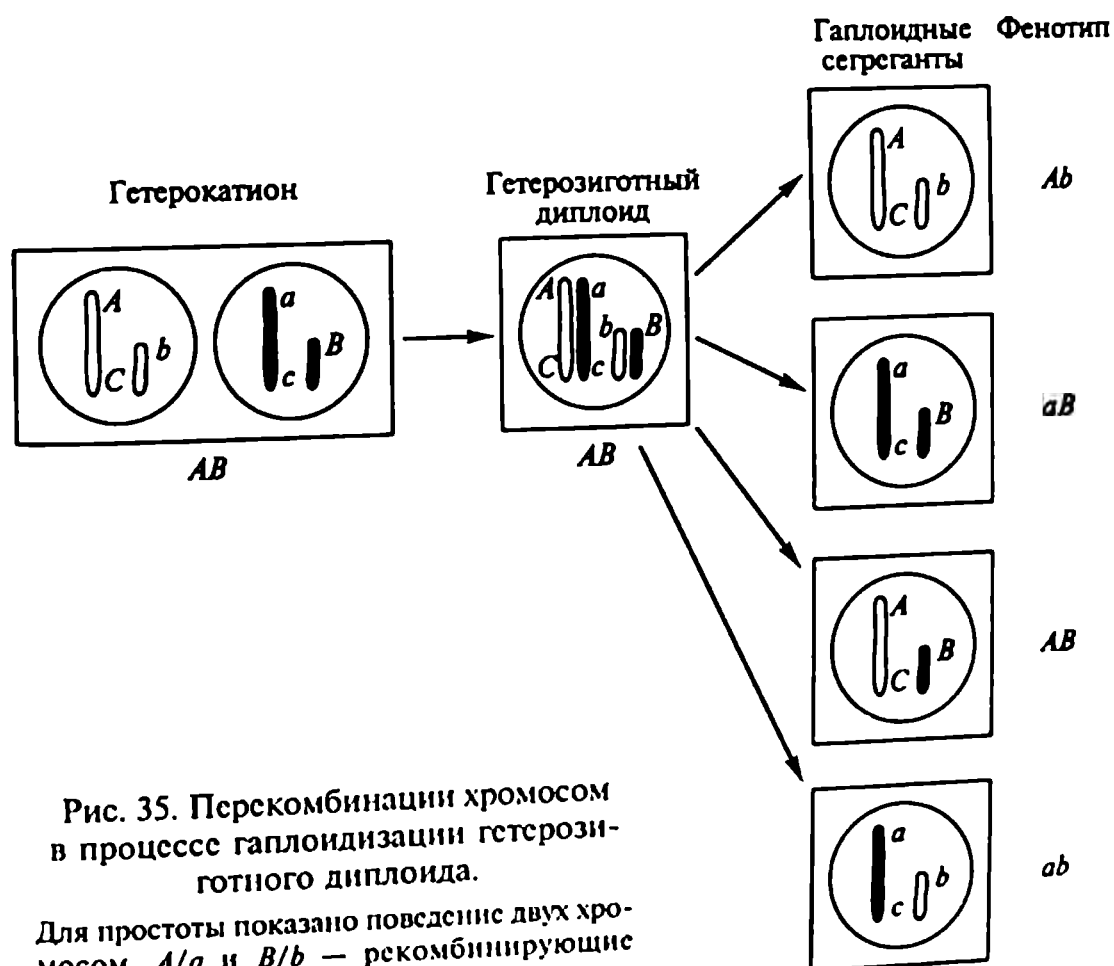


Рис. 35. Перекомбинации хромосом в процессе гаплоидизации гетерозиготного диплоида.

Для простоты показано поведение двух хромосом. A/a и B/b — рекомбинирующие гены

родительских генотипа и два рекомбинантных, один из которых фенотипически не отличим от исходного диплоида, а второй сегрегует по двум изучаемым генам (рис. 35).

Таким образом, гаплоидизация приводит к расхождению маркерных генов, находящихся на разных хромосомах. Если изучаемые гены находятся в одной группе сцепления (даже на разных плечах), они не расходятся при гаплоидизации. Гаплоидизацию при генетическом анализе используют для решения двух задач.

1. Для определения групп сцепления. Например, мы имеем два маркированных родительских штамма *Aspergillus nidulans*, один из которых характеризуется потребностью в путресцине (*pu*), аденине (*ad*), фенилаланине (*phen*), имеет желтые конидии *y* и признак *sen*; другой гаплоидный родитель с зелеными конидиями дикого типа имеет потребность в биотине (*b*) и является прототрофом по всем остальным маркерам:

<u><i>y</i></u>	<u><i>pu</i></u>	<u><i>ad</i></u>	<u><i>sen</i></u>	<u>+</u>	<u><i>phen</i></u>		
+	+	+	+	<i>b</i>	+	Данный гетерозиготный диплоид, полученный от двух гаплоидных ауксотрофных родителей, — прототроф, так как по всем локусам имеет доминантные аллели +.	

Анализ гаплоидных сегрегантов дал следующие генотипы:

n-Сегреганты:						Число штаммов	
<i>y</i>	<i>pu</i>	<i>ad</i>	<i>sen</i>	<i>phen</i>	+	7	<i>y</i> — желтые (<i>yellow</i>) конидии
<i>y</i>	<i>pu</i>	<i>ad</i>	+	+	+	11	<i>p</i> — ауксотрофность по путресцину
+	<i>pu</i>	<i>ad</i>	+	+	<i>b</i>	1	<i>ad</i> — ауксотрофность по аденину
<i>y</i>	+	+	<i>sen</i>	<i>phen</i>	+	26	<i>phen</i> — ауксотрофность по фенилаланину
<i>y</i>	+	+	+	+	+	7	<i>b</i> — ауксотрофность по биотину

Всего: 52 сегреганта

Отсюда следует, что:

- y pu* — находятся на разных хромосомах, так как признаки рекомбинируют (дают различные сочетания);
- pu ad* — на одной хромосоме, так как между этими локусами нет рекомбинации;
- ad sen* — на разных хромосомах, так как признаки рекомбинируют (имеем все 4 возможные комбинации этих признаков);
- sen phen* — имеем только родительские генотипы, значит, локусы находятся на одной хромосоме (не рекомбинируют);
- phen b* — обнаружены все 4 комбинации, значит, локусы находятся на разных хромосомах;
- y b* — на одной хромосоме, так как обнаружены только родительские генотипы.

В результате проведенного анализа комбинации признаков у гаплоидных сегрегантов получаем следующие группы сцепления:

на I хромосоме *u* + + *b*;
 на II хромосоме *pu* *ad* + +;
 на III хромосоме *sen* *phen* + +.

2. Для установления, в какой группе сцепления находится неизвестный локус. Для этого получают гетерозиготный диплоид между штаммом, несущим неизвестную мутацию, и множественно маркированным штаммом, и по расщеплению гаплоидов устанавливают группу сцепления, в которую входит неизвестная мутация.

Поскольку среди сегрегантов наряду с гаплоидными штаммами будут находиться и диплоиды, для отделения гаплоидных сегрегантов используют один из описанных выше методов, позволяющих отличить гаплоиды от диплоидов. Для грибов, имеющих большое число маркированных мутациями локусов, разработаны приемы автоматического выделения гаплоидов, основанные на отборе по двум несцепленным маркерам. Поскольку митотический кроссинговер одновременно в двух хромосомах протекает крайне редко, выделенные сегреганты, как правило, гаплоидны. Примером может быть диплоид такого типа:

I хромосома	$\frac{su}{+}$	$\frac{ad}{ad}$	} <i>su</i> — рецессивный супрессор локуса <i>ad</i> , <i>w</i> — <i>white</i> (белые конидии), + — <i>green</i> (зеленые конидии, нормальный фенотип).
	+		
IV хромосома	$\frac{w}{+}$		

Данный диплоид имеет зеленые колонии и не способен расти на минимальной среде (потребность в аденине).

Отбор ведут на среде без аденина. Выросшие колонии могут представлять собой рекомбинантные диплоиды (*su ad20/su ad20*) или гаплоиды (*su ad20*). Но все диплоиды будут зеленого цвета, так как в другой хромосоме имеется доминантный ген *w+*, а половина гаплоидов — белые (выщепляется хромосома, несущая мутантный аллель *w*). Таким образом, все белые колонии, растущие на среде без аденина, имеют гаплоидный набор хромосом.

Частота гаплоидизации достаточна для выделения гаплоидов: например, у *A. nidulans* она составляет 10—50 % от общего числа сегрегантов. У некоторых грибов она может быть еще выше. Так, диплоиды *Verticillium dahliae* нестабильны и быстро расщепляются вследствие гаплоидизации. У дрожжей сахаромикетов и головневового гриба *Ustilago maydis*, наоборот, гаплоиды вообще не получены.

Частоту гаплоидизации можно повысить добавлением в среду веществ, связывающихся с белками микротрубочек и наруша-

ющих нормальное функционирование нитей веретена, — пара-фторфенилаланином, фунгицидом беномилом.

Нерасхождение хромосом

Причиной этого события, как и гаплоидизации, являются нарушения в митозе, в результате которых 4 хроматиды не расходятся синхронно по дочерним клеткам. Возникают клетки с 3 и 1 или 4 и 0 хроматидами ($2n + 1$ — трисомии или $2n + 2$ — тетрасомии). Клетки с недостающим числом хромосом возвращаются, как описаны выше, к гаплоидному состоянию или погибают, а клетки с избытком теряют одну или две хромосомы, возвращаясь к исходной дисомии. Поскольку случайно теряется любая лишняя хроматида, это может привести к рекомбинации генов, как это показано ниже:

Гетерозиготный диплоид						Фенотипы	
<i>su</i>	+		<i>y</i>	<i>ad</i>	+	+	+
+	<i>su</i>		+	<i>ad</i>	<i>bi</i>	(зеленые ауксотрофы по аденину)	
Удвоение хромосом перед митозом						+	+
Трисомик, возникший в результате нерасхождения одной хромосомы						+	+
Потеря одного гомолога: $2/3$						+	+
<i>su</i>	+		<i>y</i>	<i>ad</i>	+	+	+
+	<i>su</i>		+	<i>ad</i>	<i>bi</i>		
$1/3$						+	+
<i>su</i>	+		<i>y</i>	<i>ad</i>	+	+	+
<i>su</i>	+		<i>y</i>	<i>ad</i>	+	(желтые прототрофы)	

Как видно, нерасхождение хромосом, как и гаплоидизация, приводит к пересортировке целых хромосом и указывает на группы сцепления. Отличия между ними заключаются в том, что ядра остаются диплоидными. Поэтому данное явление редко используется в генетическом анализе, ибо отличить диплоидные сегреганты, возникшие вследствие нерасхождения хромосом, от диплоидов, возникших вследствие кроссинговера, можно только при наличии множественно маркированных линий грибов. В приведен-

Митотический кроссинговер

В отличие от процессов рекомбинации, описанных выше, при митотическом кроссинговере происходит рекомбинация маркеров, находящихся в одной группе сцепления. Исследования Э. Кэфер и Р. Холлидея позволили сделать следующие заключения: 1) митотический кроссинговер подобно мейотическому протекает на стадии 4 нитей; 2) обмениваются две несестринские нити; 3) в результате обмена возникают реципрокные продукты. Рассмотрим это на следующем примере:

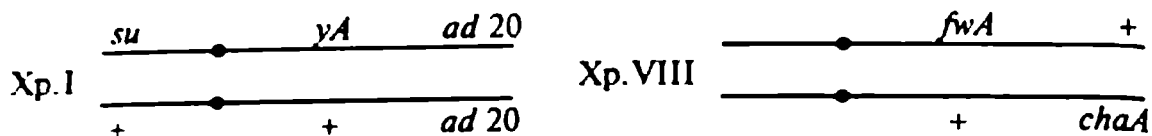
		Фенотипы			Фенотипы
1	$\frac{d a b c}{d a b c}$	+ + + +	1.3	$\frac{d a b c}{+ + b c}$	+ + b c
2	$\frac{d a b c}{+ + + +}$		2.4	$\frac{d a + +}{+ + + +}$	
3	$\frac{+ + + +}{d a + +}$	+ + + +			
4	$\frac{+ + + +}{+ + b c}$				

Таким образом, если рекомбинирующие локусы находятся в *цис*-конфигурации, то: 1) рекомбинируют все маркеры, находящиеся дистальнее точки обмена (между *b* и *c*); 2) из 4 возникающих комбинаций генов одна комбинация родительская и три рекомбинантные; 3) по изменению фенотипов из трех рекомбинантных комбинаций можно обнаружить только одну. Если же рецессивные аллели, находящиеся дистальнее точки обмена, находятся в *транс*-конфигурации, то можно обнаружить два сегреганта с выщепившимися гомозиготными рецессивными аллелями:

		Фенотипы			Фенотипы
1	$\frac{d a b +}{d a b +}$	+ + + +	1.3	$\frac{d a b +}{+ + b c}$	+ + b +
2	$\frac{d a b +}{+ + + c}$		2.4	$\frac{d a + c}{+ + + c}$	
3	$\frac{+ + + c}{d a + c}$	+ + + +			
4	$\frac{+ + + c}{+ + b +}$				

Для автоматического отбора сегрегантов разной природы специально сконструированы штаммы *A. nidulans*. Например, на правом плече хромосомы VIII в *транс*-положении находятся две мутации, меняющие окраску конидий, — *fwA* (желтовато-коричневые конидии) и *chaA* (травянисто-зеленые); на правом плече хромосомы I — рецессивный супрессор аденинзависимости — *su ad20*, а на левом плече той же хромосомы имеются два маркера — го-

мозиготный, по мутации *ad20*, и гетерозиготный, по желтой окраске конидий у:



При отборе сегрегантов, растущих на среде без аденина (по *su*), все гаплоиды будут иметь или желто-коричневые, или ярко-зеленые колонии, а диплоиды — или темно-зеленые (окраска дикого типа), возникшие в результате кроссинговера на левом плече хромосомы I между центромерой и локусом *su*, или желтые, возникшие вследствие нерасхождения хромосомы I и выхода мутации у в гомозиготное состояние.

Частота митотического кроссинговера невелика. Появление сегрегантов по цветным маркерам у *A. nidulans* составляет 0,1 — 0,3 % в среднем на одно хромосомное плечо (с учетом всех плеч — около 3 %). При сравнении частот мейотической и митотической рекомбинаций у *A. nidulans* по одним и тем же маркерам число последних оказалось в 1000 раз ниже, чем первых. Однако если сравнить число митозов и мейозов, которые протекают в течение жизненного цикла, то вклад митотической рекомбинации и мейотической окажется сравнимым. У дрожжевых грибов частота митотического кроссинговера выше, чем у мицелиальных (у *Schizosaccharomyces pombe* — 1 % от мейотического кроссинговера, у *S. cerevisiae* — до 10 %).

В экспериментальных работах частоту митотического кроссинговера можно повысить УФ-облучением. Особенно эффективно облучение прорастающих конидий. Поскольку частота митотического кроссинговера является функцией двух редких явлений — спаривания гомологичных хромосом и обмена их участками, УФ-облучение повышает частоту одного из этих событий или их обоих. Высокий эффект облучения прорастающих конидий обусловлен митозами, сопровождающими рост ростковой трубки.

Митотический кроссинговер является реципрокным событием. Это удобно наблюдать у гриба *Verticillium albo-atrum* (Hastie, 1967), имеющего определенную специфику конидиеобразования. Его конидионосцы состоят из аксиальных гиф, несущих мутовки фиалид. Каждая фиалида имеет одно ядро, которое подвергается многочисленным митотическим делениям. От фиалиды отпочковываются конидии, в каждую из которых попадает по одному ядру — продукту митоза, в то время как другие ядра остаются в фиалиде и продолжают делиться митотически. Аккуратно взяв микроминипулятором цепочку конидий, отходящих от одной фиалидной почки, легко определить их генотипы. Если митотический кроссинговер, происходящий в фиалиде, приведет к сегре-

гации изначально гетерозиготного маркера, то непосредственно образованная конидия будет гомозиготной по одной аллели, и все дальнейшие конидии, образующиеся от нее, будут гомозиготными по другой аллели. При образовании конидий до момента кроссинговера они окажутся гетерозиготными. Таким образом, по числу образующихся генотипов среди отдельных фиалид можно выяснить, в каком месте происходит кроссинговер. Если митотический кроссинговер происходит в фиалидах, то можно обнаружить реципрокные продукты митозов при конидисобразовании.

Картирование

Парасексуальный процесс с успехом используют для картирования мутантных локусов. Картирование включает следующие шаги: 1) с помощью гаплоидных сегрегантов устанавливают группы сцепления; 2) порядок расположения маркеров на плече внутри групп определяют с помощью анализа сегрегации в результате митотического кроссинговера; 3) принадлежность разных плеч к одной хромосоме и положение центромеры устанавливают по сочетанию первого и второго методов анализа.

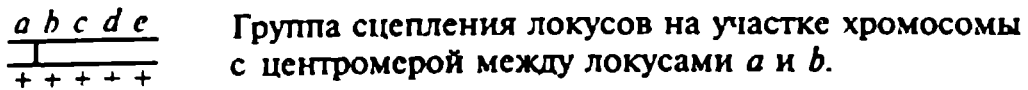
При определении последовательного расположения маркеров на хромосоме надо учитывать, что все маркеры, расположенные дистальнее точки обмена, показывают абсолютное сцепление с селектором, поэтому их последовательность установить невозможно. Все маркеры, расположенные между центромерой и точкой обмена, остаются гетерозиготными и сохраняют дикий фенотип диплоида. Следовательно, картировать можно лишь маркеры, находящиеся между точкой обмена и селектором. В связи с этим к селектору предъявляют два требования: 1) он должен быть удобным для отбора и 2) он должен быть как можно более удален от центромеры. Для определения расположения маркера у выделенных по выбранному селектору сегрегантов проверяют фенотип и сравнивают его с фенотипами исходных штаммов и диплоида. Например, если у множественного маркированного по одной хромосоме штамма (что устанавливается на основании изучения гаплоидных сегрегантов), изображенного на схеме, в качестве селектора выбран локус *b*, то мы будем иметь диплоид следующего фенотипа:

$$\begin{array}{c} a \ b \ c \ d \ e \\ + \ b \ c \ d \ e \end{array}$$

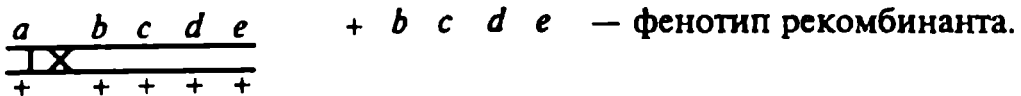
Отсюда можно сделать два вывода: 1) локус *a* расщепляется независимо от остальных и, по-видимому, находится на другом плече хромосомы; 2) маркеры *c*, *d*, *e* абсолютно сцеплены с се-

лектором, т.е. находятся дистальнее него, так что установить их порядок невозможно.

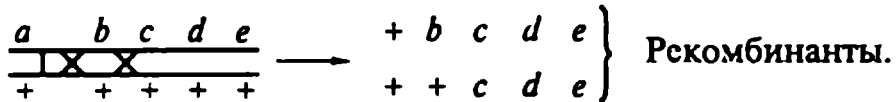
Необходимость соблюдения данных требований к селектору можно продемонстрировать, рассмотрев следующие ситуации:



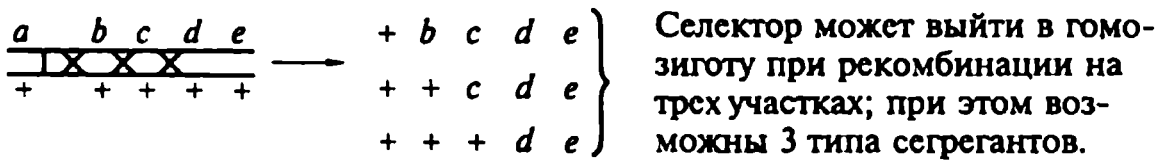
Если в качестве селектора выбран локус b , то в анализе будет появляться только один класс рекомбинантов:



Если селектор находится в положении c , то данный селектор (и все локусы, расположенные дистальнее его) будет выходить в гомозиготу при рекомбинации на двух участках — между центромой и локусом b , а также между локусами b и c ; при этом получатся 2 типа рекомбинантов:



Если селектором является локус d , то можно получить 3 типа рекомбинантных фенотипов:



Таким образом, если в качестве селектора выбрана мутация локуса c , то ее переход в гомозиготное состояние может быть вызван кроссинговерами между центромой и геном b (в этом случае фенотип сегрегантов будет $+ \ b \ c \ d \ e$) или между генами b и c (с фенотипом сегрегантов $+ \ + \ c \ d \ e$). На этом основании можно сделать заключение, что локус b ближе к центромере, чем c , а локусы d и e — дистальнее его, и их взаимное расположение установить невозможно. Что касается локусов b и c , то при принятии гипотезы о равновероятной частоте кроссинговера в любой точке по соотношению описанных двух классов сегрегантов можно судить об их относительном расстоянии от центromеры и друг от друга. Если в качестве селектора выбран локус d , то, рассуждая таким же образом, можно сделать заключение об обнаружении трех классов сегрегантов ($+ \ b \ c \ d \ e$; $+ \ + \ c \ d \ e$; $+ \ + \ + \ d \ e$), установить порядок их расположения на хромосоме ($b \ c \ d \ e$) и подсчитать относительные расстояния между центромой и локусами b , c , d (расстояние до локуса e , расположенного дистальнее селектора, определить невозможно).

Пример. Было взято два штамма *A. nidulans*:

- 1) *su ad20 paba pro y bi ribo an* — фенотип гетерозиготного диплоида;
- 2) + *ad20* + + + + + + + + + + *ad*.

По данным анализа расщепления, при гаплоидизации все маркеры находятся на одной хромосоме.

Отбор диплоидных сегрегантов проводили по двум селекторам: по *su* (на среде без аденина) и по *y* (желтой окраске сегрегантов).

1. Отбор по *su*:

Фенотипы:		Число сегрегантов
+	(<i>su</i> + +)	24
<i>ribo</i>	(<i>su ribo</i> +)	9
<i>ribo an</i>	(<i>su ribo an</i>)	62
<i>ribo an</i>	<i>paba pro y bi</i>	7

Всего: 102

Расположение маркеров *su*, *ribo*, *an* на основании анализа показано в скобках. Что касается маркеров *paba*, *pro*, *y*, *bi*, то они не могут быть расположены ни дистальнее селектора *su* (в таком случае они всегда, а не только у семи сегрегантов, переходили бы в гомозиготное состояние), ни проксимальнее него, ибо не расщепляются. Вероятно, они расположены на другом плече хромосомы и стали гомозиготными вследствие нерасхождения при митозе, а не митотического кроссинговера. Для из анализа, следовательно, необходим другой селектор.

2. Отбор по *y*:

<i>y bi</i>	(+ + <i>y bi</i>)	72
<i>y bi paba</i>	(+ <i>paba y bi</i>)	57
<i>y bi paba pro</i>	(<i>propaba y bi</i>)	15
<i>y bi paba pro ribo an</i>		3

Три сегреганта, давшие аномальное расщепление, возникли вследствие нерасхождения хромосом при митозе, остальные — вследствие митотического кроссинговера. Поскольку локус *bi* всегда переходит в гомозиготу вместе с локусом *y*, можно полагать, что он находится дистальнее последнего, поэтому определить его расстояние от центромеры не представляется возможным. Все сегреганты, гомозиготные по *pro*, гомозиготны и по *paba*. Следовательно, локус *pro* находится ближе к центромере, чем *paba*.

Описанным способом устанавливают последовательность маркеров. Расстояние между ними и центромерой обозначают в условных единицах карты. За 100 условных единиц принимают расстояние от центромеры до селектора. Расстояние между генами вычисляют по формуле: $Nx = 100/Ny$, где Nx — число гомозигот по картируемому гену; Ny — число гомозигот по гену-селектору.

Для расчета расстояния между маркерами в приведенном выше примере от числа гомозигот, полученных по каждому плечу, не-

обходимо отнять гомозиготы, возникшие вследствие нерасхождения хромосом. Получим следующую карту:

Левое плечо хромосомы I	Центромэра	Правое плечо хромосомы I
<i>su riho an</i>		<i>pro paba y bi</i>

Из изложенного понятно, почему для обозначения расстояния используются не морганиды, а условные единицы карты. На основании парасексуального анализа остается неизвестной истинная длина хромосомных плеч, так как за 100 единиц берут не все плечо, а лишь расстояние до селектора. Если бы в вышеприведенном примере в качестве селектора правого плеча была выбрана не желтая окраска сегрегантов (*y*), а отсутствие роста на среде без биотина (*bi*), то расстояния между локусами получились бы иными. Поэтому расстояния на одной хромосоме или на одном хромосомном плече нельзя сравнивать с другими.

У *A. nidulans* имеется половой процесс, и доступен анализ при половом расщеплении. При сравнении хромосомных карт этого гриба, построенных с помощью анализа при половом и бесполом расщеплении, оказалось, что число групп сцепления и порядок расположения на них маркерных генов одинаковы, в то время как расстояния между ними различаются.

Таким образом, генетический анализ сегрегации при митозах является важным подспорьем гибридологическому анализу, так как позволяет с помощью относительно небольших выборок сегрегантов получить ценную информацию по наследованию ряда признаков. Особенно важен он для грибов, лишенных полового процесса, но представляющих большое практическое значение (*A. niger*, *Penicillium chrysogenum* и др.). Вместе с тем полный парасексуальный процесс, описанный у *A. nidulans*, протекает не у всех грибов. У *Neurospora crassa*, *Cladosporium lagenarium*, *P. digitatum* не удалось выделить даже гетерозиготные диплоиды, у сахаромицетных дрожжей и *Ustilago maydis* не образуются гаплоидные сегреганты, а у *Verticillium dahliae* редок митотический кроссинговер.

ЧАСТЬ II

ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ

Глава 4

БЕСПОЛЫЙ ЦИКЛ

Развитие большинства грибов включает два цикла — бесполой и половой. У одних грибов половой цикл редуцирован (например, отсутствуют гаметы и гаметангии), у других он развивается только при определенных экологических условиях (у некоторых фитопатогенных грибов — при переходе к сапротрофному питанию), у третьих (дейтеромицетов) необратимо утрачен.

У некоторых грибов, наоборот, отсутствует или редуцирован бесполой цикл (высшие базидиомицеты). Начнем рассмотрение генетического контроля развития с бесполого цикла.

Грибы могут существовать в трех жизненных формах — мицелиальной (большинство таксонов), дрожжеподобной и плазмодимальной.

У многих видов две первые жизненные формы могут при определенных условиях переходить одна в другую. Плазмодимальная жизненная форма присуща небольшому числу видов хитридиевых грибов и генетически недостаточно исследована. Поэтому остановимся лишь на рассмотрении двух первых.

Генетический контроль дрожжевого роста

Вегетативный цикл дрожжей сахаромицетов включает следующие фазы: митотическое деление ядра, образование почки, миграция дочернего ядра в почку, отделение почки от материнской клетки, увеличение размеров дочерней клетки. Весь цикл продолжается немногим более полутора часов. Поскольку мутации, подавляющие отдельные этапы клеточного цикла, летальны, гены, контролирующие протекание этих этапов, были исследованы с помощью условно-летальных температурочувствительных (*ts*) мутаций в лаборатории американского генетика Л. Хартвелла, получившего за эти работы Нобелевскую премию. Из 1500 исследованных *ts*-мутантов 148 влияли на протекание клеточного цикла. Они были названы *cdc* (*cell division cycle*). Каждая мутация прерывала клеточный цикл в определенной фазе.

Последовательность процессов клеточного цикла изучали с помощью двойных мутантов. Например, если двойной мутант *cdc7, cdc4* имеет такой же фенотип, как простой мутант *cdc7*, то процесс идет от *cdc7* к *cdc4*, если же двойной мутант имеет фенотип *cdc4*, то мутация *cdc4* предшествует в цикле мутации *cdc7*. Таким образом, удалось расположить все мутации на временной карте ядерного цикла протяженностью 100 мин (рис. 36). После этого были клонированы основные гены и исследованы их продукты — белки, регулирующие протекание отдельных этапов клеточного цикла.

Большинство исследованных белков относились к двум функциональным группам: долгоживущим *протеинкиназам* и короткоживущим *циклинам*.

Киназы регулируют экспрессию ядерных генов, но они активны только при соединении с определенными циклинами. Поскольку циклины нестабильны (например, продолжительность полужизни $t_{1/2}$ циклина CLN2 составляет 8 мин), активность циклинозависимых киназ (CDK — cyclin dependent kinases) в продолжении ядерного цикла меняется, т.е. разные этапы цикла регулируются разными киназами.

После отделения почки Cdc28p-киназа обеспечивает увеличение размеров клетки, достигающих максимума во время поздней фазы G_1 . Эту фазу называют *стартом* клеточного цикла. В фазу старта индуцируются удвоение полярного тела веретена (ПТВ), почкование, инициация синтеза ДНК и репрессия процессов, обуславливающих половой цикл (слияние клеток). Для активации Cdc28p требуются циклины G-фазы — Cln1p, Cln2p и Cln3p. На стадии старта экспрессируются и другие гены, в частности ген *CDC25*, активизирующий аденилциклазу.

В S-фазе образуются циклины группы CLB (Clb1p—Clb6p), которые в соединении с Cdc28p-киназой обеспечивают репликацию ДНК на стадии G_1 , а также конденсацию хромосом и митоз в стадии G_2 . Оперирующие на стадии S другие белки представляют собой тимидилаткиназу (Cdc8), они обеспечивают репарацию ДНК (Cdc4).

Для протекания митоза важную роль играют продукты генов *CDC14* и *CDC15* или *TUB1* и *TUB2*, которые контролируют синтез белка микротрубочек веретена — тубулина. При их повреждении образуются клетки с крупными безъядерными почками.

При почковании наблюдается экспрессия генов *CDC24*, *CDC42* и др. Их продукты локализуются на мембране, обеспечивают транспорт Ca^{2+} к мембране, обозначая место возникновения почки.

Продукт гена *NUM1* контролирует движения материнского ядра в место соединения материнской клетки и почки; мутанты по этому гену имеют двухъядерные материнские клетки и безъядерные

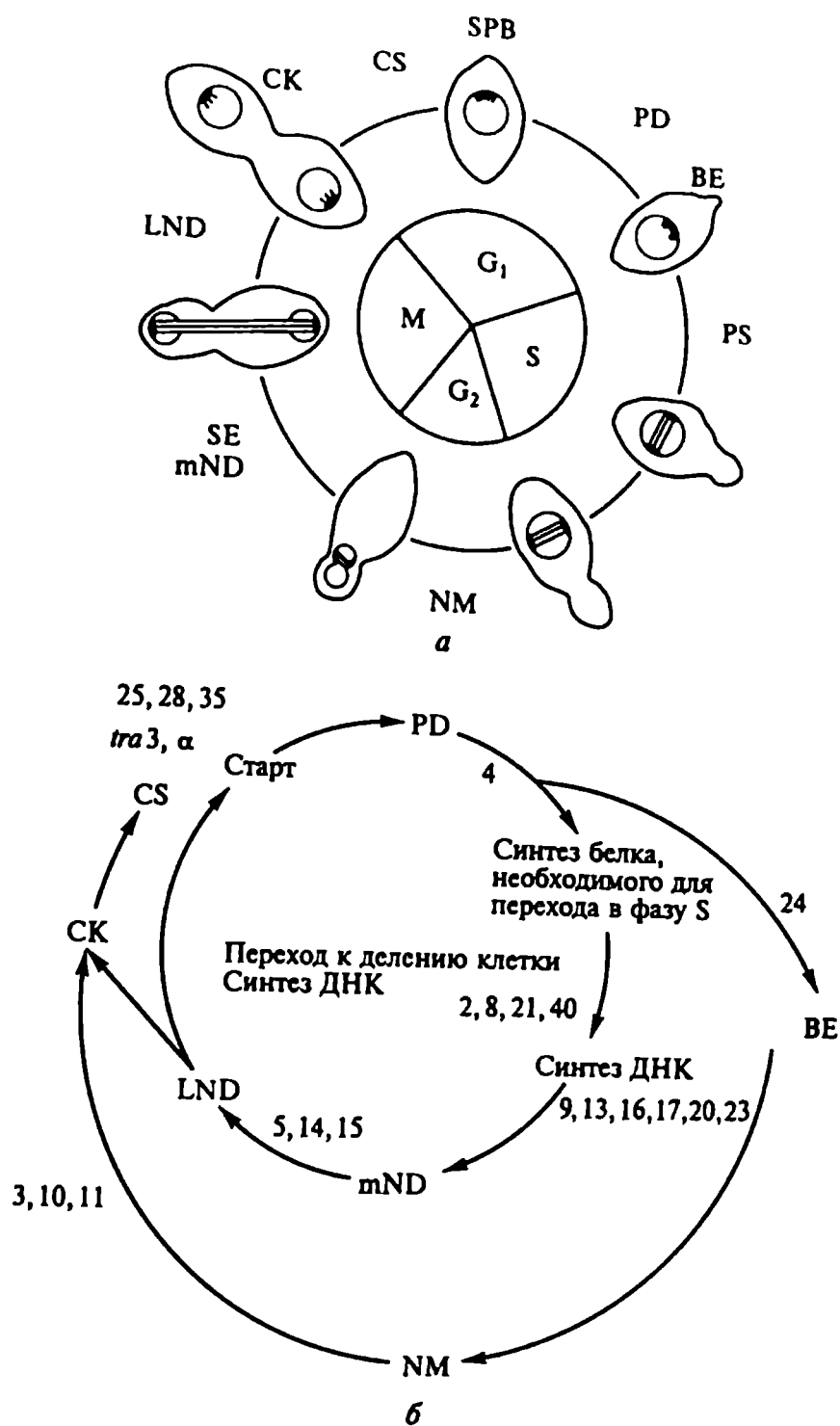


Рис. 36. Клеточный цикл *Saccharomyces cerevisiae*:

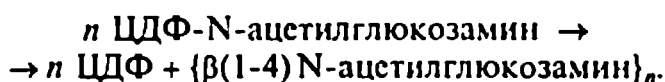
а — этапы клеточного цикла; *б* — гены, контролирующие прохождение отдельных этапов; SPB — полярное тело веретена; PD — дупликация SPB; BE — появление почки; PS — разделение SPB; NM — миграция ядер; SE — растяжение веретена; mND — начало деления ядра; LND — окончание деления ядра; CK — цитокinesis; CS — разделение клеток; M, S, G₁, G₂ — фазы клеточного цикла. Цифры на рис. *б* обозначают номера *sdc*-мутаций

Таблица 10. Макромолекулы клеточной стенки
Saccharomyces cerevisiae (M. Klis et al., 2002)

Макромолекулы	% сухого веса стенки	Степень полимеризации	Разветвленность молекулы
Маннанопротеины	35 — 40	200	Высокая
β 1,6-глюкан	5 — 10	140	Высокая
β 1,3-глюкан	50 — 55	1500	Умеренная
Хитин	1 — 2	190	Линейные молекулы

почки. Наконец, гены *CDC36*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* необходимы для протекания цитокинеза и формирования септы. Некоторые их продукты представляют собой белки — филаменты.

В процессе отделения почки большое значение имеет синтез хитина, который катализирует фермент хитинсинтетаза, соединяющий отдельные мономеры в линейную цепочку хитина по схеме:



Хитин — минорный компонент клеточной стенки дрожжей-сахаромикетов (табл. 10). Небольшое его количество (1—2 % от веса стенки) равномерно распределенное в оболочке, важно для ее интеграции.

Однако при почковании образуется хитиновое кольцо, опоясывающее почку. После формирования почки между ней и материнской клеткой с помощью хитинсинтетазы откладывается хитиновая пластинка, которая при разделении клеток расщепляется другим ферментом — хитиназой.

Секвенирование генов хитинсинтетазы у грибов, относящихся к разным таксонам, позволило выделить несколько классов этого фермента.

В геноме дрожжей найдены гены хитинсинтетазы, относящиеся к разным классам (главным образом, к классу III) и выполняющие различные функции. Мутационный и делеционный анализы показали, что продукт гена *CHS1* катализируют образование минорного хитина в оболочке вегетативных клеток и защиту от находящейся в периплазме эндохитиназы (она разрушает хитин в септе между материнской и дочерней клетками), а продукт гена *CHS2* — образование хитиновой пластинки при почковании. Наиболее важна хитинсинтетаза *CHS3*, ответственная за синтез более 90 % хитина в стенке. Мутации гена *CHS3* делают клетки осмотически чувствительными, меняют их морфологию, агрегацию и подавляют способность клеток к удлинению под действием половых феромонов.

Генетический контроль мицелиального роста

У большинства мицелиальных грибов бесполой цикл представлен тремя фазами: *прорастание спор, вегетативный рост мицелия, спороношение*.

Прорастание спор

В конидиях клеточный цикл ингибирован на стадии G_1 . При прорастании арест клеточного цикла прекращается и начинают внутриклеточные процессы: набухание (гидратация) конидии, синтеза РНК и белка, активация энергии для синтеза клеточной стенки, деление ядер, образование и удлинение ростковой трубки. Перед первым клеточным делением происходят три ядерных деления (образуется 8 ядер). Образование септы инициируется после того, как длина ростка превысит три диаметра споры. Перед образованием септы откладывается актиновое кольцо, указывающее на место ее формирования. Исследование генетического контроля этих процессов возможно лишь с помощью условно-летальных температурочувствительных мутаций. Среди большого числа *ts sep* (*separate defective*) мутаций *A. nidulans* «ранние» (*sep B, E, I, J*) влияют на образование первой перегородки, в частности, ген *sep B* кодирует белок, требующийся для расхождения хромосом в митозе; «поздние» (*sep A, D, G, H*) регулируют более поздние этапы образования перегородок в гифах. Мутанты *ts* по этим генам образуют при рестриктивных температурах несептированные, обильно дихотомически ветвящиеся гифы.

Удобной моделью для изучения процессов, связанных с формированием септы у грибов, являются делящиеся дрожжи *Schizosaccharomyces pombe*. У них образуется только одна септа, формирование которой сопряжено с окончанием митоза. В интерфазе частицы F-актина сконцентрированы на полюсах клетки вследствие полярного роста. В начале митоза они перемещаются в центр, образуя актиновое кольцо, которое наряду с актином содержит миозин и другие белки (формин, Cdc12p, Cdc8p, Cdc15p и др.). Вслед за распадом митотического веретена актиномиозиновое кольцо во взаимодействии с новой мембраной начинает сжиматься одновременно с центрипетальным отложением полисахаридного материала новой септы — α -1,3-глюканом, β -1,3-глюканом, β -1,6-глюканом, α -галактоманнаном. Регуляция процессов образования септы осуществляется белками, локализованными в области SPB. Эти белки образуют каскад трансдукции сигнала, известный как SIN (*septation initiation network*). Мутанты по контролирующим их генам формируют длинные, многоядерные, быстро лизирующиеся клетки. Начальный белок каскада —

ГТФаза Spg1p. Активированный ГТФ (Spg1p-ГТФ), этот белок через серию протеинкиназ передает сигнал на ген *CPS1*, контролирующий синтез β -1,3-глюкансинтетазы — фермента, необходимого для построения первичной септы. Негативная регуляция SIN-каскада осуществляется двухкомпонентным комплексом Cdc16p/Byr4p, который переводит ГТФазу Spg1p из активного состояния Spg1p-ГТФ в пассивное — Spg1p-ГДФ. Мутации в генах *cdc16* и *byr4* вызывают неконтролируемые процессы формирования септ, независимые от стадии клеточного цикла.

Вегетативный рост колонии

У мицелиальных грибов форма колонии определяется такими показателями, как линейная скорость роста, частота ветвления и угол отхождения ветвей, соотношение между субстратным и воздушным мицелиями и т. п. На скорость роста и морфологию колонии могут оказывать влияние как внешние условия, так и ядерный статус изучаемого штамма гриба. Например, у базидиомицетов гомо- и гетерокариотические колонии (первичный и вторичный мицелий) отличаются многими морфометрическими показателями (табл. 11).

Получено большое число морфологических мутаций, носители которых имеют те или иные культурально-морфологические отклонения от нормального для данного штамма роста колоний. Такие мутации *Neurospora crassa* были детально исследованы в лаборатории известного американского генетика Э.Тейтума. Их классификация приведена в табл. 12.

Как видно, мутанты, помещенные во вторую и третью строки, отличаются от дикого типа главным образом скоростью роста (они формируют компактные колонии разных размеров — от очень маленьких до медленно распространяющихся), а у мутан-

Таблица 11. Средние морфометрические показатели вегетативного роста семи гомо- и гетерокариотических штаммов культивируемого шампиньона *Agaricus bisporus* (О. В. Камзолкина, 1996)

Штаммы	Скорость роста, мм/сут	Частота ветвления (расстояние от апекса до 3-го ветвления, мкм)	Угол бокового ветвления, град	Толщина гифы, мкм	Толщина клеточной стенки, нм
Гомокариотичные	0,74	396	45	1,17	80
Гетерокариотичные	1,00	449	34	1,44	55

Таблица 12. Морфологические мутанты *Neurospora crassa*
(N. Mishra, 1977, с изменениями)

Тип роста	Морфологические изменения	
	не зависят от условий роста	зависят от условий роста
Нормальный	Path — нормальный рост в присутствии сорбозы	Дикий тип (<i>wl</i>)
Ограниченный	True colonial — <i>col-1</i> , 2..., button	Дикий тип в присутствии сорбозы
Ограниченный вначале, переходит в нормальный	Spreading colonial — <i>spsc 1</i> , 2	Semicolonial — <i>smco</i> ; нормальный рост зависит от влажности и содержания CO ₂
Культурально-морфологические различия при сохранении неограниченного роста	а) spreading morphological — скудный рост, тонкие гифы, отсутствие конидий; б) смешанный тип (<i>frost</i> , <i>ragged</i> , <i>ballon</i> и др.)	Morphological environmentally influence — <i>моe</i> ; морфология колонии зависит от условий роста

тов из 4-й строки наблюдаются не количественные, а качественные отличия от дикого типа.

Биохимическое изучение показало, что все исследованные мутанты имеют изменения в строении клеточной стенки. У аско- и базидиомицетов клеточная стенка включает следующие компоненты (от мембраны наружу): хитин, пептиды и глюкан. Последний состоит из трех фракций — пептидоглюкан (фракция I), из которого состоят внешние фибриллы наружного слоя стенки, средний аморфный слой (фракция II) и β -1,3-глюкан (фракция III) — внутренние фибриллы наружного слоя.

К настоящему времени исследовано около 1000 морфологических мутантов *N. crassa*, генетические повреждения которых влияют на ряд биохимических факторов, играющих роль при синтезе клеточной стенки: 1) регуляторы актина и микротрубочек цитоскелета; 2) протеникиназы и другие компоненты сигнальной системы; 3) компоненты секреторных механизмов; 4) ферменты, участвующие в формировании клеточной стенки; 5) ферменты, участвующие в биосинтезе мембран. У большинства мутантов нарушена структура компонентов клеточной стенки.

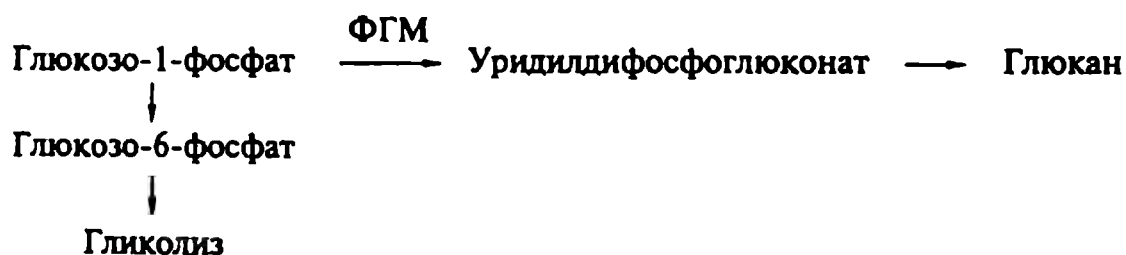
Хитин. У *N. crassa* обнаружено несколько генов хитинсинтазы. При инактивации гена *chs1* возникают медленно растущие, морфологически уродливые гифы, но септы и конидии образуются нормально. Мутанты по гену *chs3* летальны и могут сохраняться только в гетерокарионе с ядрами дикого типа. Повреж-

ление генов *chs2* и *chs4* не сказываются на морфологии. Из пяти генов хитинсинтетазы *Aspergillus nidulans* только у двух обнаружен фенотипический эффект мутаций: повреждение гена *chsB* (класс III хитинсинтетаз) вызывает замедленный рост, а синтетаза *csmA* (класс V), имеющая домен моторного белка миозина, необходима для поляризации синтеза клеточной стенки: повреждение гена вызывает внутригифальный рост новых гиф.

Пептиды. У многих *col*-мутантов обнаружено снижение содержания пептидов; особенно резко падало содержание в них аспарагина и глютаминовой кислоты.

Глюканы. У многих морфологических мутантов наблюдается или повышение фракции I, или снижение фракции III. В стенке мутанта *sl* (сферопласт) вообще содержится только хитин, клетки теряют жесткость, ригидность и ведут себя, как после обработки улиточным ферментом (имеют вид сферопластов). Изменения в содержании глюканов (а также, маннанов) обусловлены изменениями в составе и активности ферментов, регулирующих их синтез. Эти изменения можно свести к следующим пунктам.

■ Дефект в синтезе ферментов, прямо или косвенно участвующих в биосинтезе глюканов. Например, у мутанта *N. crassa ragget* подавлен биосинтез фосфоглюкомонофосфатазы (ФГМ) — фермента, катализирующего реакцию в точке разветвления катаболизма и анаболизма углеводов:



Поэтому у мутанта *ragget* очень низкое содержание β -1,3-глюкана в стенке.

■ Дефект в синтезе или ингибирование активности ферментов биосинтеза клеточной стенки. У мутанта *smco-9* инактивирован фермент ветвления (branching enzyme) — α' -1,4-глюкан: α -1,4-глюкан-6-глюкозилтрансфераза, катализирующие образование α -1,4 связей при биосинтезе полисахаридов. Из мутантного штамма выделен термостабильный ингибитор этого фермента — белок с молекулярной массой 100 кДа. У колониальных температурочувствительных мутантов (*col*) формируются компактные колонии с сильно ветвящимися гифами. Такой фенотип обусловлен дефектом в синтезе маннозилтрансферазы. Мутанты содержат в стенке лишь половинное количество маннозы и галактозы и теряют способность к анастомозам.

Таблица 13. Изменение активности ферментов у морфологических мутантов *N. crassa* (N. Mishra, 1977)

Фермент	Штамм	Активность, усл. ед.
Глюкоциклоальдолаза (НАД ⁺ -зависимая)	Дикий тип	3,3
	Inos	0,0
Глюкозоизомераса	Дикий тип	3,8
	Gpi-1	0,0
Аденилциклаза	Дикий тип	40,0
	cr-1	1,3
Ферменты, автолизирующие клеточную стенку	Дикий тип	27,9
	Asp-1	5,5
	Asp-1	10,8
	Дикий тип	100
	<i>Srco-1</i>	600
Галактокиназа	Дикий тип	1,2
	Gal-2	0,54
<i>L</i> -глутамин- <i>D</i> -фруктозо-6-фосфатамидо-трансфераза	Дикий тип	0,58
	Pcas-2	1,01
	Clock	0,93

■ Перепродукция ферментов, вызывающих автолиз клеточной стенки. Изменение формы колоний часто связано с более интенсивным ветвлением мицелия. Мутации, оказывающие подобное воздействие, содержат больше ферментов, лизирующих углеводы клеточной стенки. Например, мутация *srco-1* вызывает сильное ветвление мицелия и высокую активность глюканазы и протеазы. Сходный эффект можно наблюдать при обработке нормальных штаммов улиточным ферментом, который расщепляет полисахариды.

■ Изменение в содержании цАМФ — универсального гормона, регулирующего уровень углеводов в клетке. У мутанта *cr-1* сильно понижена активность фермента аденилциклазы.

Сводные данные по изменению активности ферментов углеводного метаболизма у морфологических мутантов *N. crassa* приведены в табл. 13.

Спорообразование

Проблема генетического контроля споруляции привлекает к себе большое внимание вследствие общего интереса к проблемам онтогенеза и, в частности, морфогенеза. Исследования этих процессов прошли три этапа: получение и классификация мута-

ций; генетический анализ методами классической генетики; анализ кодирующих макромолекул методами молекулярной генетики. Рассмотрим некоторые примеры подобных исследований у грибов из разных таксонов.

Зигомицеты

У *Phycomyces blakesleanus* выделены следующие стадии спорогенеза: 1) удлинение апекса спорангиеносца с одновременным его вращением по часовой стрелке; 2) остановка роста и вращения, формирование спорангия; 3) слабое удлинение субспорангиальной зоны со слабым вращением против часовой стрелки; 4) резкое удлинение спорангиеносца (со скоростью до 3 мм/ч) с вращением по часовой стрелке. Получены мутанты, у которых в фазе 4 вместо быстрого вытягивания происходит расширение субапикальной зоны спорангиеносца с качанием против часовой стрелки (рис. 37). Спорангиеносный аппарат мутантов похож на аппарат грибов из рода *Pilobolus*, поэтому мутация получила название *pil*. Она указывает на место переключения двух программ реализации морфогенеза стилоспорангиев: мукороидной — с удлинением субспорангиальной зоны и пилоболоидной — с ее расширением.

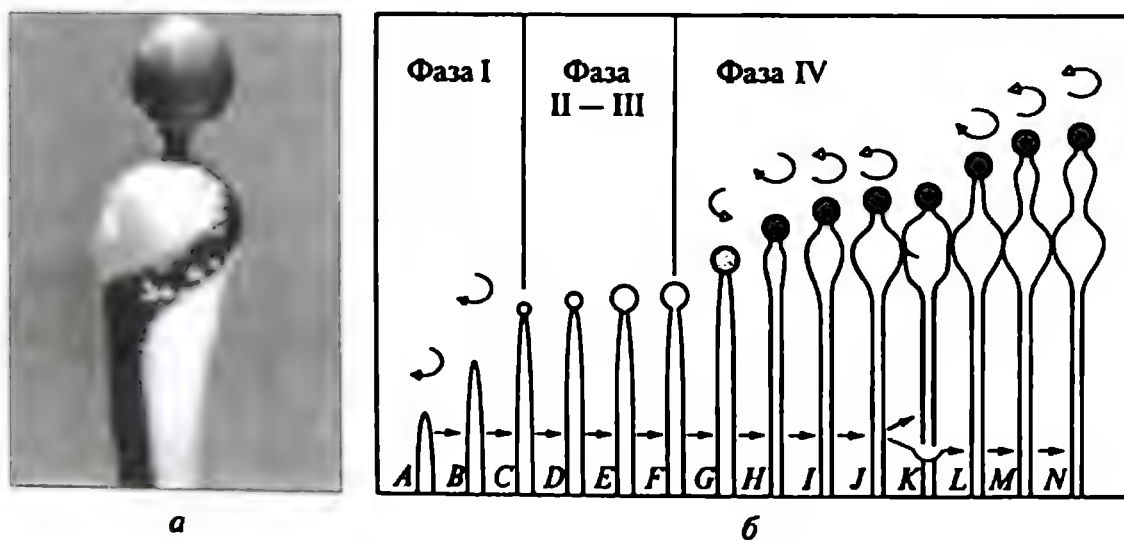


Рис. 37. Спорангиеносец пилоболоидного (*pil*) мутанта *Phycomyces blakesleanus* (К. Koga et al. 1980):

a — сканирующая электронная микроскопия мутанта; *б* — диаграмма развития мутантного спорангиеносца (показаны стадии роста). Видно, что на последней стадии роста (IV) вместо удлинения верхушки спорангиеносца происходит его расширение

Аскомицеты

Сумчатые и несовершенные грибы имеют два основных типа конидиогенеза: *таллический* — без пролиферации конидиогенных клеток и *бластический* — конидиогенные клетки пролиферируют, давая многочисленные конидии.

Таллические конидии

Таллоконидии присущи *Neurospora crassa*. Конидиогенез этого гриба включает следующие этапы:

формирование воздушных гиф (аэрогенез) — удлинение гиф — формирование конидиеносцев — миграция ядер в кончик конидиеносца — формирование перетяжки — увеличение размера кончика гифы (проконидии) — формирование септы — формирование артроконидии — отделение артроконидии.

Параллельно с этими процессами ядра мигрируют в субконидиальную часть конидиеносца, которая претерпевает такие же превращения. Так формируется легко распадающаяся цепочка конидий.

Получена серия мутаций, выключающих отдельные этапы конидиогенеза:

sc (*scumbo*) — медленный рост, не формируются воздушные гифы;

cpt (*carpet*) — короткие воздушные гифы, нет конидий;

acon-2, *acon-3* (*aconidiate*) — нет миграции ядер, не формируется перетяжка;

fl (*fluffy*) — не утолщается кончик конидиеносца (нет проконидии);

csp-1, *csp-2* (*conidial separation*) — цепочка конидий не разделяется.

Две последние мутации обусловлены потерей активности аутолитических ферментов, растворяющих септы (их активность составляет 20—30 % к штаммам дикого типа). Эти мутации локализованы на хромосомах II и VII, являются рецессивными и комплементируют в гетерокарионе.

Наступление конидиогенеза можно индуцировать условиями роста (голоданием, повышением концентрации CO₂). В таких условиях гибридизацией с мРНК неспорулирующей культуры выделена фазоспецифичная мРНК и клонирована комплементарная ей кДНК.

Ген *fluffy* (*fl*) отвечает за переключение программы развития с мицелиального роста на формирование конидиеносцев. Белок FL имеет массу 88 кДа и содержит обычный для грибных регуляторных белков мотив связывания с ДНК (Zn²⁺Cys₆), т.е. является ре-

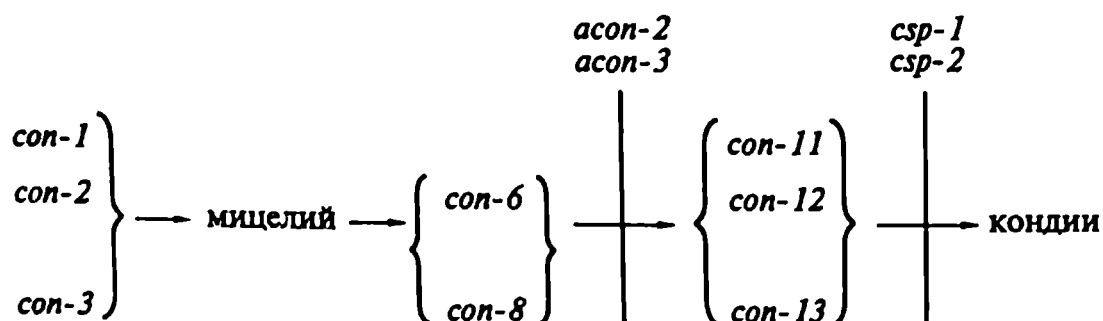
Таблица 14. Гены *N. crassa*, ответственные за конидиогенез
(A. Roberts, C. Yanofski, 1989)

Показатель	Клонированные гены				
	<i>con-6</i>	<i>con-8</i>	<i>con-10</i>	<i>con-11</i>	<i>con-13</i>
Размер, тыс. н. п.	0,66	1,25	0,66	1,35	1,75
Время накопления мРНК после индукции конидиогене- лиза, ч	0—2	2—4	4—8	4—8	4—8
Гибридизация с мРНК					
дикий тип, мицелий	+/-	-	-	-	-
дикий тип, конидии	++	++	++	+	+
<i>csp-1</i>	++	++	++	++	++
<i>csp-2</i>	++	++			
<i>fl</i>	+	++			
<i>acon-3</i>	++	++			
<i>acon-2</i>	++	++			

гулятором транскрипции. Его мишень — промоторная область гена *eas* (*csg-2*), кодирующего гидрофобный морфогенетический белок гидрофобин.

Характеристика серии генов *N. crassa*, ответственных за конидиогенез у *N. crassa*, представлена в табл. 14.

Таким образом, гены, ответственные за разные этапы конидиогенеза, не гибридизируются с мРНК мицелиальной культуры (не экспрессируются в ее ядрах), но гибридизируются с спорулирующей культурой. Матричная РНК мутантов, у которых конидиогенез прерван на ранних этапах (*fl*, *acon*), гибридизируется лишь с генами, экспрессируемыми первыми (*con-6*, *con-8*). Очередность включения (и выключения) генов конидиогенеза у *N. crassa* следующая:



Область *con-8* включает 2 экзона и 3 интрона.

Бластические конидии

Более сложные процессы протекают при формировании бластоконидий. Генетическая регуляция их морфогенеза исследована у гриба *Aspergillus nidulans*. Его морфогенез начинается с формирования вертикально отходящих от погруженного в субстрат мицелия крупных многоядерных клеток-ножек. Верхушка клетки расширяется в пузырек (везикулу), в которой концентрируются ядра. В результате почкования на поверхности пузырька формируется слой одноядерных клеток — первичных стеригм, или метул. Почкование метул дает начало также одноядерным вторичным стеригмам — *фиалидам*. Последние, подобно стволовым клеткам, пролиферируют, давая клоны одноядерных спор (рис. 38). После каждого митоза ядро входит в кончик фиалиды, после чего ядерные деления прекращаются на стадии G_0 , и ядро начинает управлять синтезом клеточной оболочки конидии. После следующего митоза в фиалиде формируется новая конидия, которая отодвигает предыдущую. Образуется базипетальная цепочка спор, в которой самая старая (и самая крупная) — базальная.

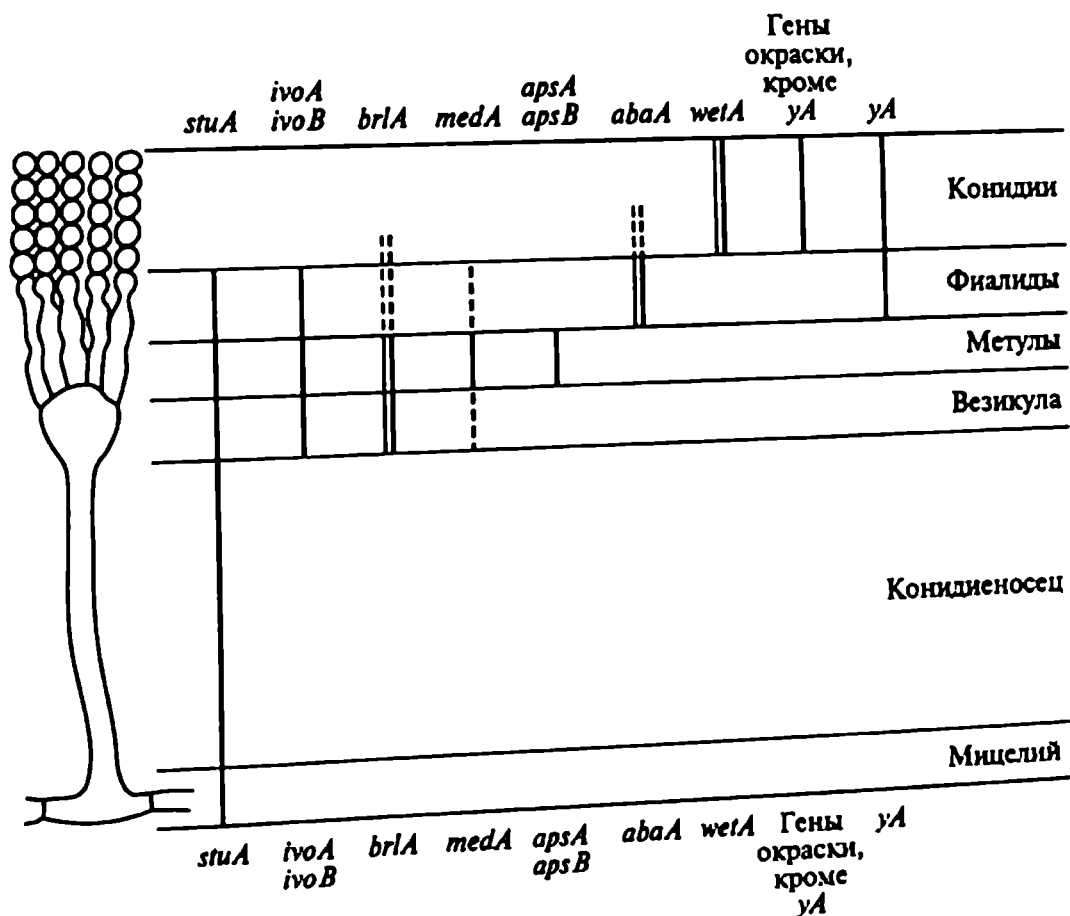


Рис. 38. Структура конидиального аппарата *Aspergillus nidulans* и места блокирования конидиогенеза разными *con*-мутациями (S. D. Martinelli, 1979)

Параллельно с морфогенезом протекает пигментация. Она обусловлена тем, что, в отличие от погруженных в субстрат гиф, конидиогенный аппарат находится на поверхности и должен обеспечить защиту ядер от ультрафиолетовых лучей. В стенке конидиеносца откладывается меланиноподобный серо-коричневый пигмент, образующийся вследствие окисления предшественника специфической фенолоксидазой — крезолазой. Накопление крезолазы совпадает по времени с формированием конидиогенных структур. В оболочке конидий откладывается темно-зеленый пигмент, образующийся в результате окисления желтого предшественника *пара*-дифенолоксидазой (лакказой). Ее синтез начинается позднее, чем крезолазы, уже во внутренних слоях оболочки фиалиды, и совпадает со временем формирования конидий.

Систематическое изучение конидиальных мутаций начал в 60-х годах XX в. А. Клаттербак, который разделил их на стратегические и тактические (вспомогательные — ауксиллярные). Первые подавляют конидиогенез или изменяют время его наступления, вторые прерывают на какой-либо фазе.

Пример *стратегических* мутаций, вызывающих фенотип *fluffy*, — недифференцированные массы вегетативных гиф, образующие ватообразные колонии.

Примеры *тактических* мутаций (рис. 39):

bristleA — не образуется пузырек, конидиеносцы имеют вид стерильных нитей;

abacus — многократно пролиферирующие стеригмы (фиалиды), конидии не формируются;

medusa — пролиферирующие фиалиды с массой нежизнеспособных спор;

stunted (stuA) — короткие конидиеносцы с тонкой стенкой (вследствие низкой продукции глюканов);

aps (apuclear primary sterigmas) — ядра не мигрируют в метулы;

wet-white — непигментированные конидиеносцы, автолиз конидий во время созревания (споры образуют желеподобную массу) вследствие перепродукции автолитических ферментов;

wA (whiteA) — нет пигментации конидий, образуются бесцветные, нормально прорастающие, конидии;

yA (yellowA) — не синтезируется лакказа, конидии желтого цвета.

Сравнив частоту мутаций по конидиогенезу с частотой по некоторым фенотипическим признакам, управляемым известным числом генов, А. Клаттербак сделал заключение о том, что конидиогенез управляется 45—150 локусами.

Поскольку, в отличие от мицелия, конидии формируются на поверхности субстрата, конидиогенез индуцируется аэрацией и

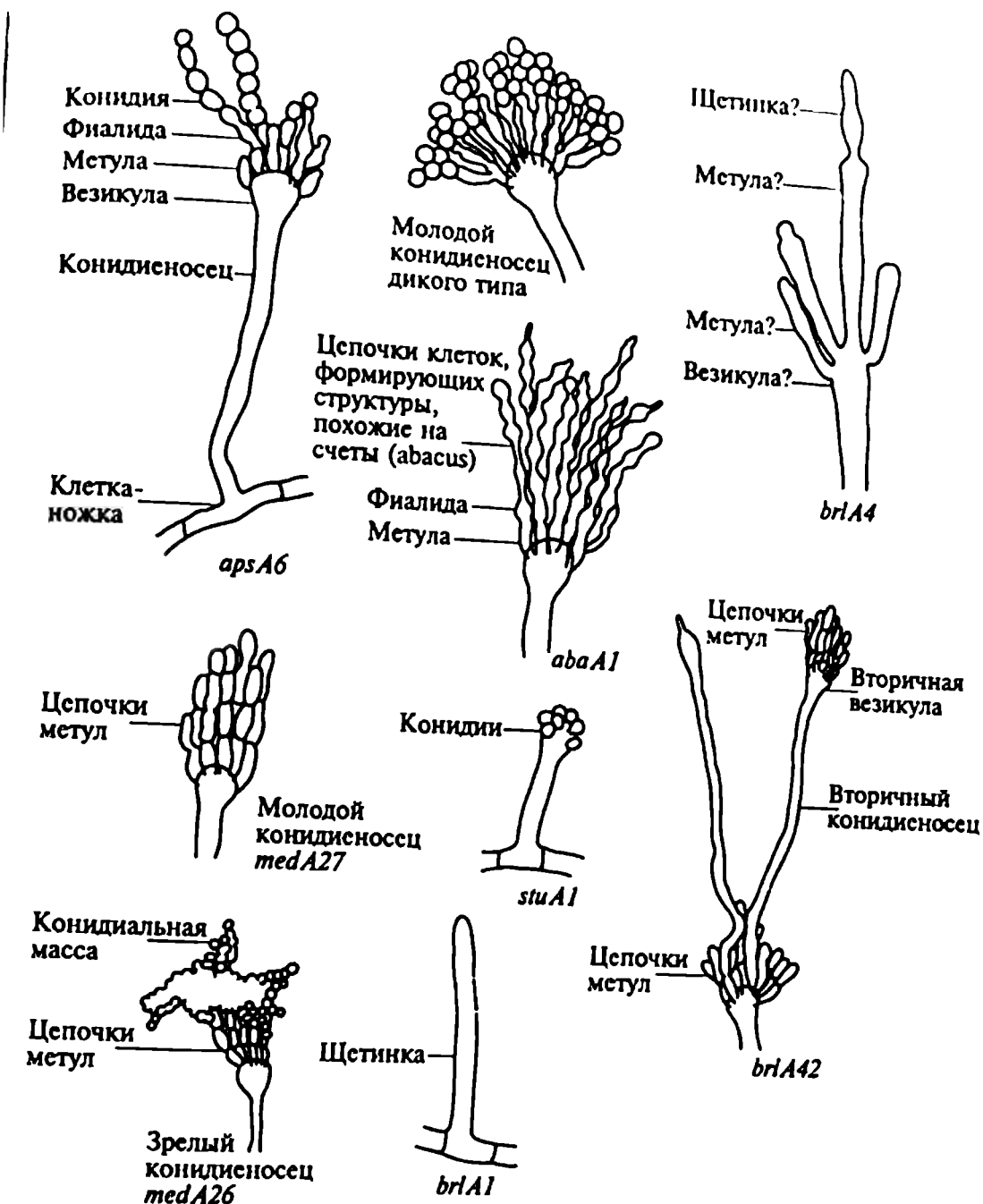


Рис. 39. Влияние разных *con*-мутаций *Aspergillus nidulans* на морфологию конидиеносцев и конидий (S. D. Martinelli, 1979)

светом (лабораторные штаммы имеют мутацию в регуляторном гене *ve1* и не реагируют на освещение). Переход от вегетативного роста к конидиеобразованию можно, следовательно, индуцировать аэрацией. Из конидиеносной культуры была выделена фракция мРНК и синтезирована комплементарная ей кДНК. Молекулярная гибридизация с мРНК, выделенной из неспороносящего мицелия, позволила провести отбор фракций, специфичных для конидиогенеза. Во всех стадиях жизненного цикла *A. nidulans* образуется около 6000 молекул мРНК, из них 1200 молекул специ-

фичны для конидиогенеза, 1000 генов управляют морфогенезом конидиогенного аппарата (их мРНК отсутствует в вегетативном мицелии и зрелых конидиях), 200 генов специфичны для зрелых конидий и, по-видимому, связаны с процессами дифференцировки и прорастания спор. По крайней мере, один из таких *spo* (*sporulation*)-генов (*spo-28*) гибридизируется с мРНК, выделенной из аскоспор, т.е. специфичен для двух фаз — бесполой и половой. Это подтверждает более ранние наблюдения о том, что некоторые конидиогенные мутации (*medA-15*, *stuA-1*) подавляют образование клейстотетциев. Из клонированной в фазе λ *spo*-ДНК выделены фазоспецифические клоны. Например, мРНК конидиогенной культуры у мутанта *yA* (желтые конидии) гибридизируют с кДНК дикого типа. Клон, не гибридизирующийся с мутантной РНК, имел ген, который у мутанта дефектен (*YA*). Таким же образом выделены гены *brlA* (отсутствуют у мутанта *bristle*), *abaA* (нет у мутанта *abacus*), *WETA* (нет у *wet-white*) и др.

brlA кодирует белок, состоящий из 432 аминокислот. Конъюгация мРНК с β -галактозидазным геном кишечной палочки (GUS) позволило гистохимически определить, что экспрессия *brlA* начинается в везикуле и продолжается в метулах, фиалидах и созревающих спорах. Продукт *brlA* — позитивный регулятор регуляторных генов *abaA*, *wetA* и структурных генов *ivoA*, *yA* и др.

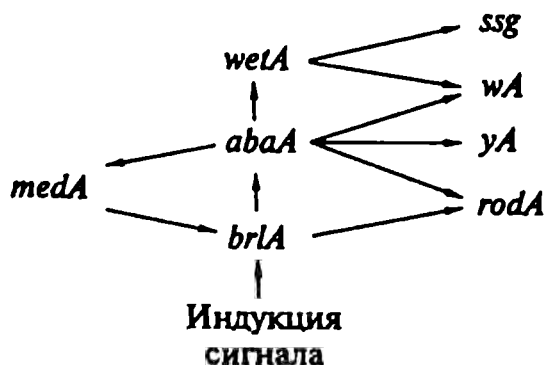
abaA кодирует белок, состоящий из 796 аминокислот. Регулирует экспрессию *brlA* и *wetA*. Регуляция первого осуществляется по принципу обратной связи (перепродукция *abaA* подавляет транскрипцию *brlA*).

wetA кодирует белок, состоящий из 529 аминокислот, который аккумулируется в фиалидах и зрелых конидиях. Регулируется продуктом *abaA* и сам регулирует экспрессию структурных генов.

apsA кодирует белок размером 183 кДа, имеющий сходство с белком NUM1p *Saccharomyces cerevisiae*, необходимым для миграции ядра в почку.

Интересна регуляторная роль продукта гена *medA*, экспрессия которого индуцируется белком АВАА, и который, в свою очередь соединяясь с белком BRLA, индуцирует *abaA*.

Общая схема регуляции конечных этапов конидиогенеза:



Однако большая часть генов, регулирующих спорогенез, экспрессируются в мицелии и конидиеносцах еще до образования везикулы, т.е. до начала транскрипции *brlA*.

Мутации по шести таким генам (*fluG*, *flbA*, *flbB*, *flbC*, *flbD*, *flbE*) приводили к возникновению фенотипа *fluffy* и подавляли экспрессию *brlA*.

Ген *fluG* гомологичен бактериальному гену глутаминсинтетазы I. Он участвует в синтезе внеклеточного фактора, который, соединяясь с рецептором на поверхности клеток, индуцирует активность продуктов генов *flbA*, *flbB*, *flbC* и *flbD*. Три последних, будучи факторами регуляции транскрипции, активизируют экспрессию гена *brlA*. Ген *flbA* репрессирует еще один ген, связанный с фенотипом *fluffy*, — *FadA* (*fluffy autolysis dominant A*). Этот ген контролирует синтез α -субъединицы в гетеротримерном сигнальном G-белке. Его инактивация снижает ГТФазную активность белка и поворачивает внутриклеточный сигнальный путь с пролиферации вегетативных гиф на споруляцию. Общая схема регуляторной активности *fluffy*-генов показана на рис. 40.

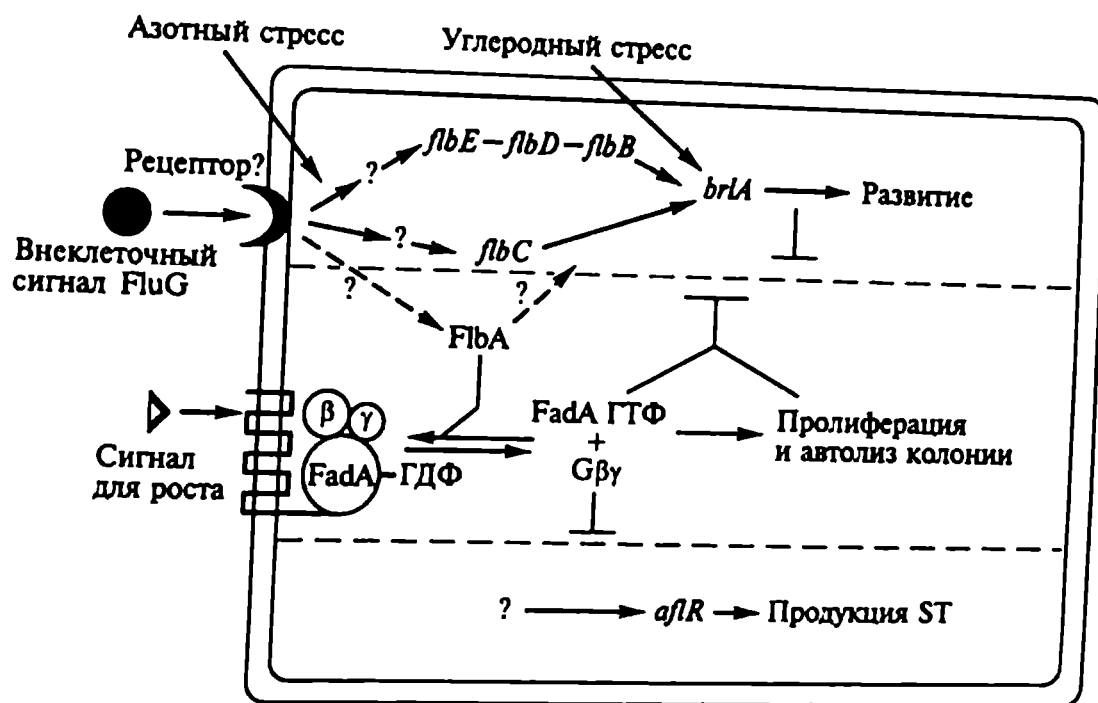


Рис. 40. Модель регуляции двух антагонистических сигнальных систем *Aspergillus nidulans* — мицелиального роста и конидиогенеза (T. N. Adams et al., 1998).

Для индукции споруляции необходимо наличие активного продукта гена *fluG*, выполняющего роль внеклеточного сигнала для активации генов *flbB*, *flbC*, *flbD* и *flbF*. Сигнальная молекула *fluG* также через белок *FlbA* инактивирует *FadA*, продукт которого, активатор ГТФазы, является эффектором пролиферации гиф и репрессором конидиогенеза, и кластер генов ST, необходимых для синтеза вторичного метаболита стеригматоцистина — предшественника афлатоксина. Инактивация *FadA* обеспечивает споруляцию и синтез вторичных метаболитов

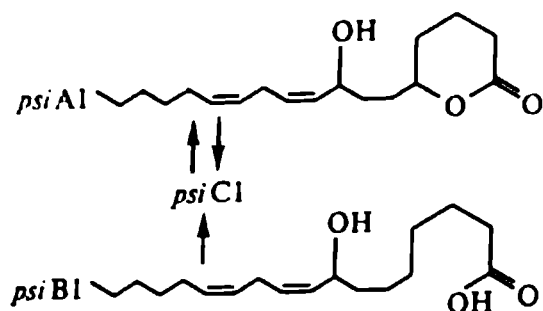


Рис. 41. Структура фактора *psi* *Aspergillus nidulans* (внизу) и его лактона (вверху) (P.S. Dyer et al., 1992).

Стрелки показывают процесс конверсии *psi*-фактора

Другая группа регуляторных генов — *acon A, B* и *C* (отсутствуют конидиальные структуры). Их продукты осуществляют конверсию так называемого *psi*-фактора (precocious sexual inducer) — C_{18} оксигирной кислоты в его лактон (рис. 41). Фактор *psi* ингибирует конидиогенез, стимулируя развитие полового морфогенеза, а его лактон не активен. Синтез репрессора ранних шагов конидиеобразования контролирует ген *velA*. В штаммах дикого типа (*velA+*) для конидиеобразования требуется

освещение (в темноте они аконидиальны).

Гены, специфичные для конидиогенеза, собраны в нескольких кластерах. Самый крупный *SPOC1* (37 тыс. н. п.) содержит 14 транскриптов и терминирован прямыми повторами, не встречающимися больше в геноме. Все гены этого кластера, за исключением одного (*L8B*), транскрибируются в зрелых спорах и составляют 11 % от общей мРНК спор.

Клонированные гены конидиогенеза были использованы для таксономических исследований представителей рода *Aspergillus*. В частности, изучали области гомологии *SPOC1*, *BRLA* и *TUBC* (ген, контролирующий продукцию белка микротрубочек тубулина и экспрессирующийся только при конидиогенезе) у пяти видов рода. Ген *TUBC* показал высокую гомологию у всех пяти видов, т.е. он высококонсервативен. В отличие от него гены конидиеобразования *A. nidulans* имели наивысшую степень гомологии с генами *A. terreus*, меньшую — с генами *A. fumigatus*, и очень низкую — с *A. niger*, *A. ochraceus* и *A. flavus*. Степень сходства генов *brlA* коррелирует с длиной конидиеносцев исследованных видов: *A. nidulans* — 75—100 мкм, *A. terreus* — 100—250 мкм, *A. fumigatus* — менее 300, *A. niger* — 200—400, *A. flavus* — 400—1000, *A. ochraceus* — 1000—1500 мкм. Поскольку ген *BRLA* управляет начальными этапами формирования конидиогенного аппарата, степень его гомологии отражает морфологическое сходство этого аппарата у разных видов.

Интересной формой конидиогенеза является микроциклическое образование конидий, при котором спора сильно разбухает и прорастает не вегетативной гифой, а конидиеносцем. Микроциклический конидиогенез индуцируется как внешними факто-

рами, так и генетически. У аспергиллов (*A. niger*, *A. nidulans*) микроциклические формы возникают после выращивания при 44 °С и избытке CO₂. В стареющих культурах *Phytophthora infestans* зооспорангии прорастают ростковой трубкой с новым зооспорангием на конце. Микроциклические мутанты получены у *Fusarium pisi* и *F. subglutinans*, причем у последнего нет даже конидиеносца, а сами конидии превращаются в фиалиды, образуя цепочки микроконидий. У эндофитных грибов, живущих внутри тканей растений-хозяев, микроциклическость — нормальная форма конидиогенеза. Их длинные нитевидные аскоспory прорастают множеством микроконидий, которые, отделяясь, в свою очередь прорастают конидиеносцем с конидией. Ростки этих вторичных конидий заражают злаки (рис. 42). За счет нескольких микроконидиальных

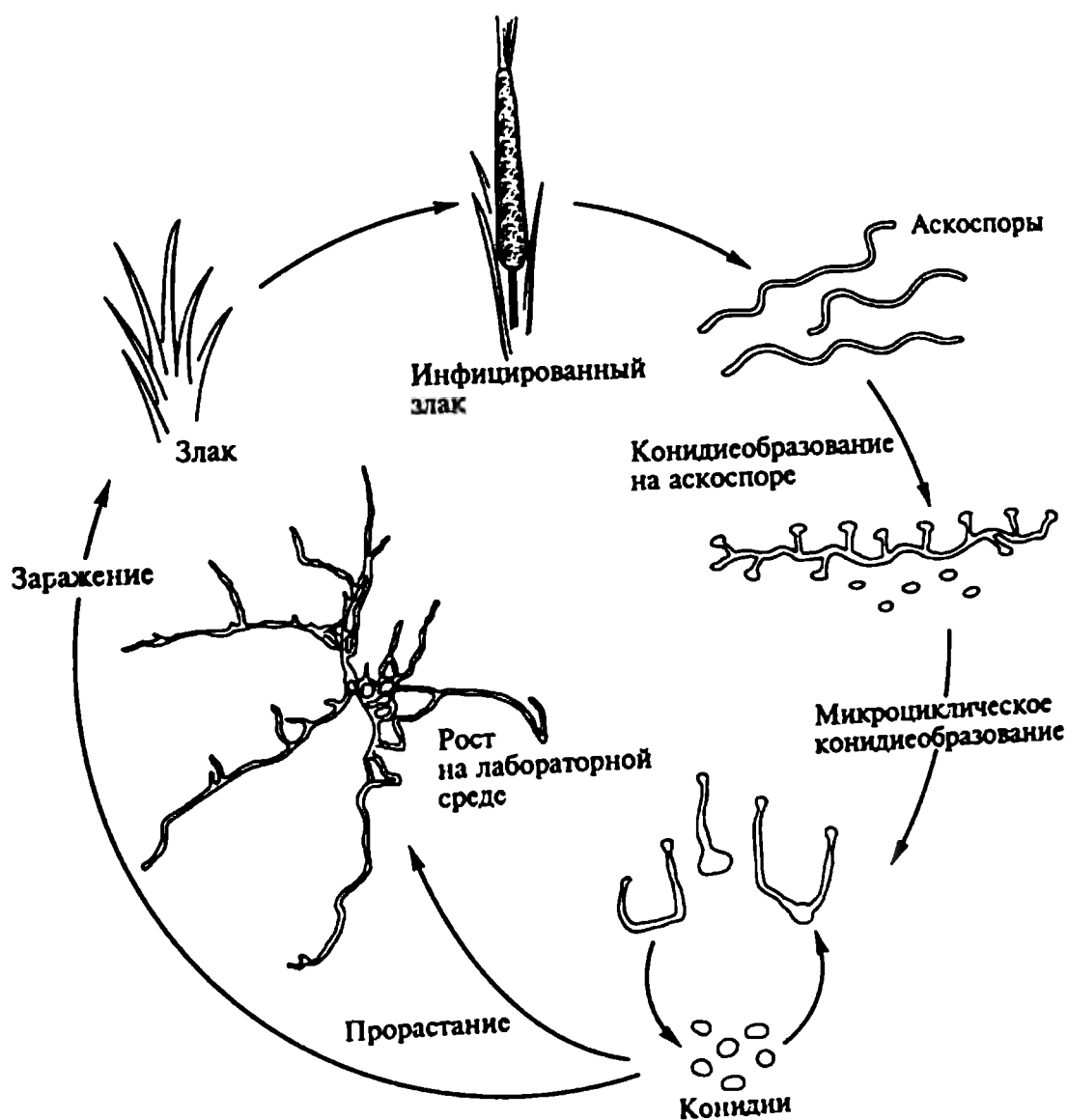


Рис. 42. Последовательные микроциклические спороношения эндофита *Epichloe typhina* (Ch. W. Bacon, D. M. Hinton, 1991)

генераций увеличивается численность инфекционных единиц, ибо в жизненной стратегии для этих грибов достижение восприимчивых тканей растений более важно, чем длительное выживание вне растения.

По-видимому, исходной для подобных мутантов была мутация *isg* (*in situ germination*), описанная у гриба *Verticillium albo-atrum*. У мутантов *isg* конидии прорастают непосредственно на фиалидах, что может быть следствием нарушения двух событий: прекращения ядерного цикла на стадии G_0 и отсутствия ингибиторов прорастания или потери чувствительности к ним.

Микроциклические формы полезны для получения большой массы конидий в процессе производства микопестицидов (грибов-паразитов вредных насекомых, фитопатогенных грибов и сорных растений).

Циркадные ритмы

Колонии многих грибов часто имеют зональную структуру. Зональность может проявляться и при росте на естественных субстратах: некоторые фитопатогенные грибы (например, из рода *Alternaria*) вызывают на пораженных листьях образование пятен с четко выраженной зональностью. Зональное расположение спор наблюдается на поверхности яблок, пораженных плодовой гнилью (*Monilia fructigena*). Зональность колоний на агаре может быть обусловлена: 1) чередованием зон вегетативного мицелия и конидиального спороношения; 2) чередованием зон вегетативного мицелия и зон, содержащих склероции или псевдосклероции; 3) чередованием зон вегетативных гиф, имеющих разный тип и интенсивность ветвления. Периодичность, или осцилляция, внутриклеточных процессов, приводящих к проявлению зонального фенотипа, разделяют на три типа ритмов: *циркадный*, *ультрадный* и *инфрадный*. Циркадный (от латинского *circa diem*) ритм имеет приблизительно 24-часовой период, т.е. совпадает с суточным ритмом. Он характерен для всех организмов — от одноклеточных до позвоночных. Ультрадные ритмы имеют периодичность от миллисекунд до нескольких часов. Наконец, инфрадные ритмы превышают суточный период (например, сезонные периоды).

Циркадный ритм должен удовлетворять нескольким условиям: 1) иметь продолжительность около 24 ч; 2) быть отзывчивым на естественно меняющиеся в суточных ритмах внешние стимулы, такие, как свет и температура, запускающие ритм, при кратковременном воздействии которых он восстанавливается; 3) иметь компенсаторный потенциал, позволяющий сохранять константный ритм в пределах широкого варьирования условий роста; 4) контролироваться генетически. У грибов наиболее исследован

генетический контроль циркадных ритмов у *Neurospora crassa*, колония которой имеет вид чередующихся колец вегетативного мицелия и зон спороношения с периодом 21,6 ч (рис. 43). Исследование генов, регулирующих циркадный ритм *N. crassa*, проводилось двумя путями.

Первый путь — изоляция фазоспецифичных мРНК в разные часы суток — астрономические часы (sidereal time) — ST0 (рассвет), ST12 (закат). Из библиотеки фазоспецифичных кДНК идентифицировано 8 *csg* (clock controlled genes)-генов, контролирующих циркадный ритм. Два гена, интенсивно экспрессирующиеся утром, — *csg-1* и *csg-2*, запускают конидиогенез. Ген *csg-1* оказался гомологичным ранее описанному гену репрессии глюкозы *grg-1*, а *csg-2* — гомологичным гену синтеза низкомолекулярного гидрофобного белка, кристаллизующегося на поверхности мицелия, гидрофобина *eae* или *bli-1*. Остальные гены *csg* также имеют пик экспрессии во время конидиогенеза. Среди них находятся и описанные ранее специфичные для конидиогенеза гены *con-6* и *con-10*. Они активизируются при переходе от света к темноте и, наоборот, от темноты к свету. При пульсирующем одноразовом освещении культуры эти гены экспрессируются все время с периодичностью в 20 часов. У мутантов *bd* и *frq-9* гены *con-6* и *con-10* светоиндуцибельны, но не светорепрессибельны.

Ген *csg-7* контролирует синтез глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, ген *al-3* — геранилпирофосфатсинтетазы — ферментов, участвующих в образовании каротиноидов (интенсивный каротиногенез сопровождается формированием воздушных гиф и спороношение). Однако конидиогенез и циркадный ритм регулируются разными генами и различными путями трансдукции сигнала.

Второй путь исследования — получение мутаций, влияющих на скорость прохождения ритма — канонических *clock*-мутантов (с испорченными часами, которые отстают или, наоборот, спешат). Такие мутации картированы в семи локусах. Их свойства приведены в табл. 15.

Лучше всего исследован локус *frq*, по которому получено несколько мутантов. Он образует два транскрипта, продукты транс-



Рис. 43. Колония *Neurospora crassa* с чередующимися областями интенсивного и слабого конидиообразования (M.Ramsdale, 1999)

Таблица 15. Мутации циркадных ритмов у *N. crassa*

Локус/аллель	Хромосома/ плечо	Период при 25°C, ч	Доминантность
<i>frq</i> (frequency) 1	VII/R	16	Полудоминантный
<i>frq</i> (frequency) 2	То же	19,3	То же
<i>frq</i> (frequency) 3	*	24	*
<i>frq</i> (frequency) 7	*	29	*
<i>frq</i> (frequency) 9	*	Аритмичный	Рецессивный
<i>chr</i> (chrono)	VI/L	23,5	Полудоминантный
<i>prd-1</i> (period)	III/C	25,8	Рецессивный
<i>prd-2</i>	V/R	25,5	То же
<i>prd-3</i>	I/C	25,1	*
<i>prd-4</i>	I/R	18	Доминантный
<i>cla-1</i> (clock-affecting)	IR/VIR(рецес- сивная трансло- кация)	27	Полудоминантный

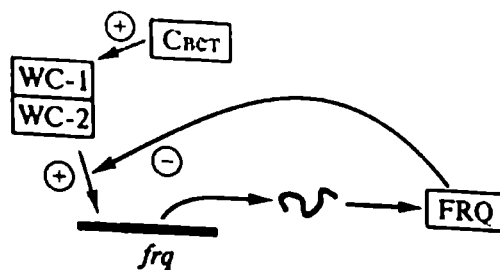
ляции которых — белки из 890 и 989 аминокислот, имеющие мотив связывания с ДНК (область, характеризующуюся, как фактор транскрипции). Гомологичные последовательности обнаружены у многих аскомицетов, даже не имеющих циркадных ритмов роста. У дрозофилы клонирован ген *per* (period), влияющий на прохождение циркадных ритмов, который гомологичен *frq*. У мутантов *frq*, изменяющих продолжительность циркадного ритма, обнаружены точковые замены аминокислот в белках.

Транскрипция *frq*-мРНК очень низка при ST0, но затем растет, достигая пика при ST2-6. Затем появляются FRQ-белки, максимальное количество которых наблюдается при ST8. Оба белка параллельно фосфорилируются, затем переходят в ядро и репрессируют экспрессию собственных мРНК (регуляция конечным продуктом), включая другие clock-элементы. По-видимому, в такой регуляции принимают участие еще два гена: *wc-1* и *wc-2* (white collar). Мутанты по этим генам аритмичны и не отзываются на свет («слепые»). Контролируемые ими белки имеют домен PAS — мотив, найденный у некоторых белков, регулирующих циркадные ритмы дрозофилы и позвоночных животных, а также у многих других белков, и функционально связанный с передачей сигнала, вызванного внешней информацией (кислород, свет), путем взаимодействия типа белок — белок.

Предложенная модель осцилляции активности *frq*-генов выглядит в связи с этим следующим образом (рис. 44). Свет вызывает образование гетеродимеров белков WC-1 и WC-2, которые акти-

Рис. 44. Модель регуляции циркадных ритмов у *Neurospora crassa* (P. L. Lakin-Thomas, 2000).

Гены часового механизма *frq* ритмически транскрибируются и транслируют белок FRQ, который транспортируется в ядро и ингибирует экспрессию генов *frq*. Для активации транскрипции гена *frq* требуются два фактора транскрипции белка — WC-1 (white collar) и WC-2, а белок FRQ ингибирует активность их гетеродимеров. Свет восстанавливает активность WC-1 и WC-2



вируют транскрипцию *frq*-генов. Их продукт — негативный регулятор FRQ, который транспортируется в ядро и ингибирует активацию транскрипции.

Мицелиально-дрожжевой диморфизм

После рассмотрения генетического регулирования мицелиального и дрожжевого роста необходимо кратко остановиться на явлении мицелиально-дрожжевого диморфизма, присущего многим грибам. Причины такого диморфизма следующие.

Физиология питания. Мицелиальные формы дейтеромицетов из рода *Verticillium* живут, как сапротрофы, в почве, но могут заражать корни, проникать в сосуды ксилемы восприимчивых растений и существовать там в дрожжеподобной форме, вызывая увядание (вилт) пораженного растения. Другой дейтеромицет, *Candida albicans*, — возбудитель глубоких микозов у пациентов с иммунодефицитом и людей с нормальным иммунным статусом. На большинстве питательных сред он растет в дрожжевой форме (эллипсоидальные бластоспоры); сыворотка млекопитающих, температура 37 °C и некоторые другие факторы индуцируют мицелиальный рост.

Состояние ядер в клетках. Базидиальные грибы из порядка Ustilaginales и сумчатые из порядка Taphrinales образуют в зараженных тканях растений хорошо развитый мицелий, клетки которого содержат по два ядра (дикарионы). Такой мицелий не может расти на искусственных питательных средах. Одноядерные споры этих грибов размножаются почкованием, образуют дрожжеподобные колонии на искусственных средах и не способны заражать растения.

Газовый состав среды. Некоторые зигомицеты из рода *Mucor* в аэробных условиях существуют в мицелиальной форме, а в анаэробных — в дрожжевой.

Таким образом, мицелиально-дрожжевой диморфизм сопровождается кардинальной перестройкой морфологии, физиологии

Таблица 16. Химический состав клеточной стенки и мембраны у двух видов грибов (%)

Клеточная стенка <i>Mucor rouxii</i>			Плазматемма <i>Candida albicans</i>		
Компоненты	Дрожжевые клетки	Гифы мицелия	Компоненты	Дрожжевые клетки	Гифы мицелия
Хитин	8,4	9,4	Белки	50,0	40,0
Хитозан	27,9	32,7	Липиды	41,0	31,0
Манноза	8,9	1,6	Углеводы	9,0	25,0

и метаболизма. При переходах из одной формы в другую изменяются физиология важнейших энергетических процессов (дыхание — брожение), образ жизни (паразитический или сапротрофный), химический состав клеточной стенки и мембраны (табл. 16).

У дрожжевых сахаромикетов в условиях азотного голодания наблюдается псевдомицелиальный рост, при котором клетки вместо овальных становятся вытянутыми; они почкуются апикально, почки не отделяются от материнской клетки, вследствие чего образуются цепочки клеток. Такой тип роста позволяет лучше осваивать бедный питанием субстрат.

Исследования показали, что при азотном голодании происходит внутриклеточная передача сигнала на ядро с помощью каскада митогенноактивных протеинкиназ (МАРК).

Сигнал об азотном голодании передается двумя небольшими белками, имеющими сайты связывания ГТФ: Ras2 и Cdc42. Далее сигнал передается на МАРК Ste20; а от него — последовательно на другие киназы: Ste11 — Ste7 — Ste12. Последний взаимодействует с белком Tec1 (рис. 45).

Композиция этих белков обеспечивает их связывание с геном — мишенью, осуществля-

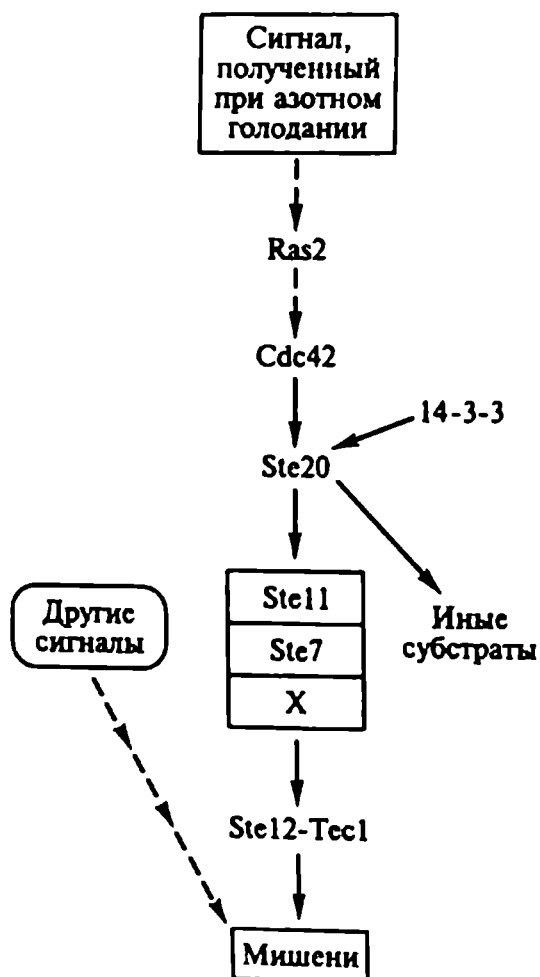


Рис. 45. Сигнальный путь активизации псевдомицелиального роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, вызванный азотным голоданием (F. Banuett, 1998)

ющим переключение программы развития с дрожжевой на псевдомицелиальную. Таковыми могут быть гены *ELM1*, *PHD1* и *SOK2*. Первый, по-видимому, контролирует синтез репрессора псевдомицелиального роста, ибо нуль-мутация этого гена делает такой рост конститутивным. Белки Phd1 и Sok2 имеют области гомологии с белками-регуляторами транскрипции генов — регуляторов клеточного цикла, а также с белком StuA *Aspergillus nidulans* — участником программы конидиального морфогенеза. Последнее наблюдение очень интересно, ибо формирование метул, фиалид и конидий на поверхности конидиеносца *A. nidulans* осуществляется не делением, а почкованием.

Переключение программы морфогенеза у *Candida albicans* определяется сходными с вышеописанными компонентами сигнальной системы — Cst20 (гомолог Ste20), Hst7 (гомолог Ste7) и Cgfl (гомолог Ste12), но есть и другие, альтернативные пути переключения.

В частности, продукт гена TUP1 является негативным регулятором мицелиального роста (делетированные по этому гену организмы имеют конституционный мицелиальный рост), а продукты генов EFG1 и CPN1, наоборот, — транскрипционные активаторы мицелиального роста, ибо делеции любого из них приводят к конституционному дрожжеподобному росту. Ген *EFG*, экспрессирующийся в фазу логарифмического роста, при переносе в геном *S. cerevisiae* обеспечивает псевдомицелиальный рост. Белок EFG1p также имеет высокую степень гомологии с белком STUA *A. nidulans*.

Диморфизм регулируется также уровнем цАМФ в клетках: высокий уровень способствует дрожжеподобному росту, низкий — мицелиальному. Возможно, азотное голодание снижает содержание внутриклеточного цАМФ.

Возраст и старение

Бактериальные клетки бессмертны, так как две дочерние клетки, возникшие вследствие деления родительской клетки, физиологически идентичны.

У дрожжей родительская клетка не может почковаться бесконечное число раз, причем число делений индивидуальной материнской клетки у разных штаммов сильно варьирует. Число прошедших делений можно установить по хитиновым кольцам, остающимся на месте отделения почки (рис. 46).

В популяции дрожжевых клеток, находящихся в логарифмической фазе роста, 50 % составляют «девственные» клетки, 25 % — клетки, претерпевшие одно деление, 12,5 % — клетки, образовавшие две почки, и т.д. Следовательно, многократно почкова-



Рис. 46. Биомаркеры старения дрожжевых клеток (D. Sinclair et al., 1998).

В каждом цикле происходит асимметричное деление, в результате которого образуются более крупная материнская и более мелкая дочерняя клетки. В результате повторных процессов на поверхности материнской клетки образуются хитиновые кольца, подсчет числа которых может быть использован для определения возраста клетки

шиеся (более 20 раз) клетки составляют ничтожную часть популяции.

Поскольку старые клетки крупнее молодых, их концентрацию можно значительно повысить в результате нескольких циклов центрифугирования в градиенте сахарозы. Сравнительное изучение генной экспрессии (фракций мРНК) в старых и молодых клетках позволило сделать заключение о генах, специфически транскрибирующихся в разном возрасте.

Например, клонированные гены *LAG1* и *LAG2* экспрессируются только в молодых клетках. Их продукты представляют собой белки, связанные с мембраной. Делеции по этим генам укорачивают длительность жизни дрожжевых клеток, а перепродукция Lag-белков — увеличивает ее.

Среди генов, экспрессия которых влияет на продолжительность жизни, наибольший интерес представляют *SIR*-гены (silence information regulation), продукт которых ингибирует репрессию ряда генов (в частности, генов *HMR* и *HML*, влияющих на тип спаривания клетки, и генов, расположенных в районе теломер). Белки Sir2/3/4 вызывают молчание этих генов на посттранскрипционном уровне вследствие деацетилирования гистонов и изменения структуры хроматина. Снижение их продукции приводит к транскрипции репрессированных локусов, т.е. к появлению в клетке генопродуктов обоих типов спаривания, потере полового цикла и старению.

В молодых клетках ядрышко представлено компактной структурой, а в стареющих оно фрагментировано, причем Sir-белки переходят из ядра в ядрышко, что делает их неспособными репрессировать генную активность.

Предполагают, что фрагментация ядрышек в стареющих клетках вызвана накоплением кольцевых молекул экстрахромосомной рДНК (*ERC*), которая играет важную роль в формировании ядрышек.

Вследствие асимметричного расхождения генома (почкования) и способности к авторепликации происходит накопление копий *ERC* в материнской клетке и фрагментация ядрышка.

Экстрахромосомные элементы влияют на продолжительность жизни и мицелиальных грибов. Выше (см. гл. 1) было показано, что старение мицелия *Podospora anserina* связано с экстрахромосомной кольцевой ДНК, образующейся в митохондриальном геноме (мтДНК).

ГЕНЕТИКА ПОЛОВОГО ЦИКЛА

Слияние двух родительских клеток почти у всех организмов находится под генетическим контролем. Наиболее простой контроль наблюдается у животных, имеющих два пола, определение которых осуществляется на уровне хромосом. У высших растений ситуация более сложная в связи с тем, что наряду с раздельно-полыми двудомными растениями имеются раздельнополые однодомные и даже обоеполые. В двух последних случаях возможно как перекрестное оплодотворение, так и самооплодотворение, однако у ряда видов последнее находится под генетическим контролем, который может быть выражен морфологически (например, гетеростилией) или физиологически (например, *S*-аллели гаметофитной несовместимости). Все эти варианты есть и у грибов. Грибы могут быть раздельнополыми двудомными (например, у *Achlya bisexualis* оогонии и антеридии находятся на разных особях), обоеполыми однодомными самостерильными (*Saprolegnia ferax*) и самофертильными (*Pyronema confluens*). Самостерильность и самофертильность могут встречаться у разных видов одного рода. Например, *Phytophthora cactorum* самофертильна, а *P. infestans* самостерильна, *Neurospora crassa* самостерильна, а *N. tetrasperma* самофертильна. Ситуация осложняется тем, что многие грибы вообще не имеют не только половых органов, но даже специальных гамет и гаметангиев. У них половой процесс осуществляется слиянием вегетативных клеток. Однако и среди таких грибов известны как самофертильные, так и самостерильные виды. Для последних важную роль играет генетический контроль плазмогамии и кариогамии.

Первая классификация, предложенная в 1904 г. А.Блексли, предлагает деление грибов на *гом*- и *гетероталлические*. Первые проходят полный цикл развития из одной споры, вторым для прохождения полного цикла необходимо на каком-то этапе цикла слияние потомства генетически различных спор. К гетероталлическим грибам относят: 1) двудомные виды, формирующие мужские и женские гаметангии на разных индивидуумах; 2) однодомные самонесовместимые виды; 3) самонесовместимые виды, вообще не формирующие гаметангиев, такие, как дрожжи, большинство базидиомицетов и др. К гомоталлическим видам относят грибы из 2-й и 3-й групп, но не имеющие генетической системы

несовместимости. Возможно поэтому Г Уайтхауз предложил в 1949 г. разделять гетероталлизм на морфологический и физиологический. Однако пользоваться терминами *гомо-* и *гетероталлизм* надо осторожно, ибо причины половой самосовместимости могут быть различными.

Рассмотрим для примера две пары видов: аскомицеты *Neurospora tetrasperma* и *N. crassa* и базидиомицеты *Agaricus bisporus* и *A. campestris*. Первый в каждой паре гомоталличен, ибо потомство одной споры может пройти весь жизненный цикл, а второй гетероталличен, так как требует слияния потомков генетически различных спор. Вместе с тем, цитологическое и генетическое изучение этих видов показало, что различия между ними крайне незначительны и с генетической точки зрения непринципиальны. Например, различия видов рода *Neurospora* заключаются лишь в том, что вследствие определенной ориентации нитей веретена во время мейотических делений ядра у гомоталличного вида два гетероаллельных ядра попадают в одну спору, которая уже исходно несет информацию о протекании полового цикла (рис. 47). Более того, отбор потомства *N. crassa* на крупноспоровость приводит к уменьшению числа спор в аске и появлению асков с четырьмя гомоталлическими спорами. Поэтому можно предположить, что *N. tetrasperma* произошла от *N. crassa* и ее гомоталлизм вторичен. Подобные виды и называют вторично- или псевдогомоталлическими.

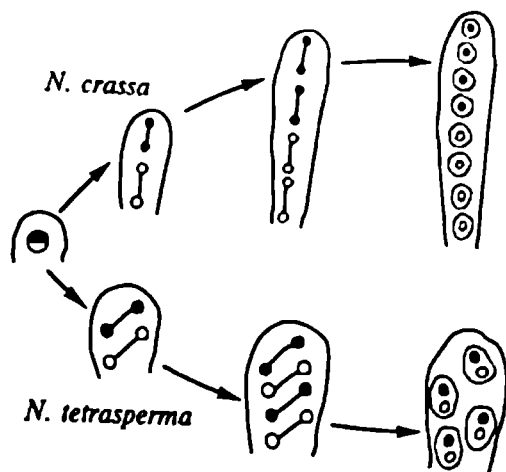
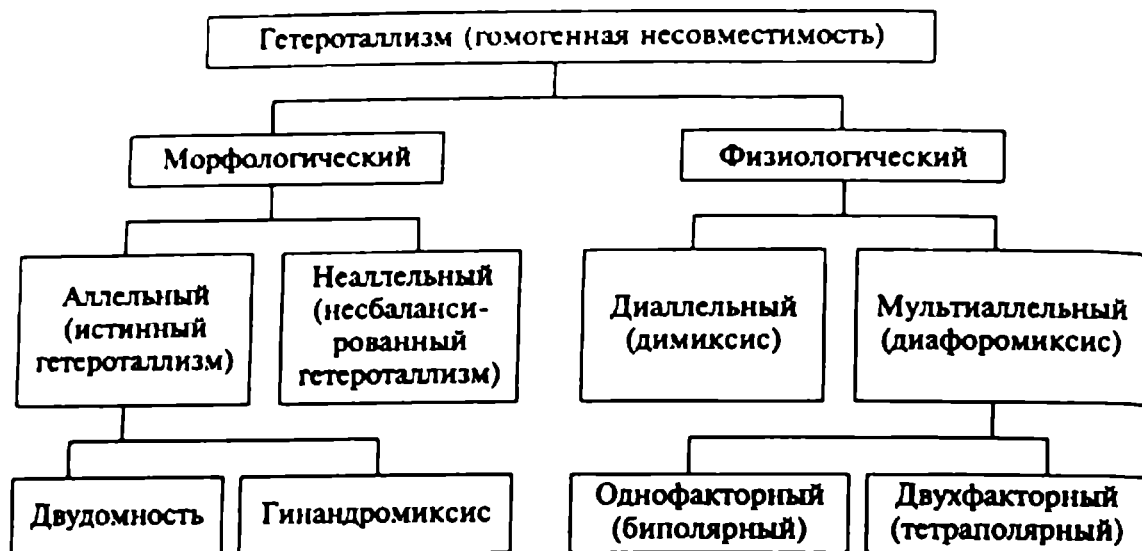


Рис. 47. Этапы формирования аско-спор у гетероталлического гриба *Neurospora crassa* и псевдогомоталлического *N. tetrasperma*

Дж. Барнет (1968) разделил системы спаривания грибов на три основные категории: 1) гомоталлизм или при наличии самофертильных гаметангиев гомомиксис; 2) биполярный гетероталлизм, или *димиксис* (предусматривает наличие двух полов или двух типов спаривания); 3) *диафоромиксис* — наличие многих генов, обуславливающих способность партнеров к спариванию. Грибы, входящие во вторую и третью категорию, обладают, по определению К. Эссера (1961), гомогенной несовместимостью, ибо сливаются лишь особи, гетерогенные по локусу спаривания.

Объединив вышеприведенные дефиниции, можно представить варианты генетического контроля полового процесса в виде схемы:



Морфологический гетероталлизм

Двудомность встречается у грибов редко. Даже амбисексуальные виды оомицетов (*Achlya bisexualis*, *A. ambisexualis*) при изучении большого числа штаммов обнаруживают множество переходных типов (рис. 48). Как видно из рисунка, штаммы ахлии при встрече с одним партнером формируют женские органы — оогонии, а при встрече с другим — антеридии, т.е. их сексуальность относительна. Это обусловлено количественным соотношением половых феромонов антеридиола и оогониола, индуцирующих формирование антеридиев и оогониев. Поэтому такой тип полового процесса получил название *гинандромиксиса* (от gyna — женское и andro — мужское начало). Генетический анализ показывает, что наследование пола в этом случае полигенное.

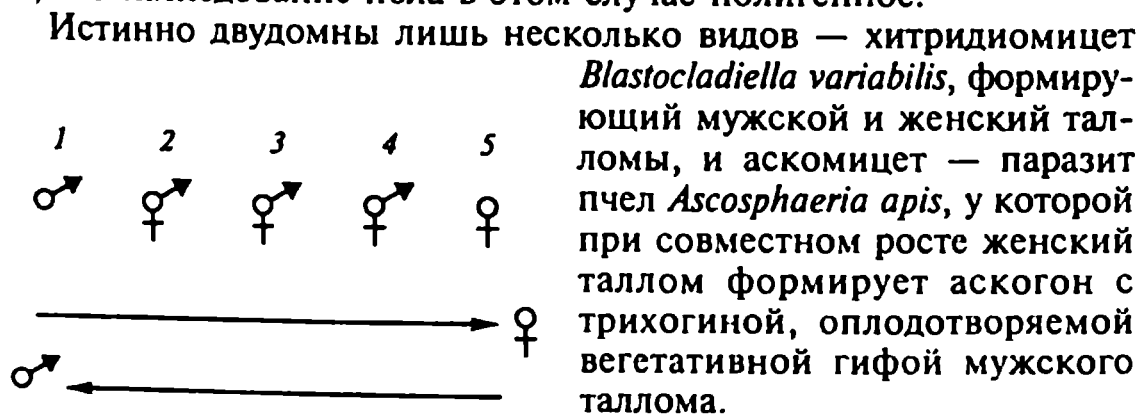


Рис. 48. Гинандромиксис *Achlya bisexualis*.

Вверху — номера штаммов. Внизу стрелками показана их потенциальная способность формировать антеридии или оогонии относительно друг друга

Blastocladiella variabilis, формирующий мужской и женский талломы, и аскомицет — паразит пчел *Ascosphaeria apis*, у которой при совместном росте женский таллом формирует аскогон с трихогиной, оплодотворяемой вегетативной гифой мужского таллома.

Несбалансированный морфологический гетероталлизм описан у природных мутантов *Nectria haematococca* (син. *Hyphomyces solani f. sp. succrbitae*). У двуполовых штаммов этого гриба часто встреча-

ются раздельнополые мутанты, не продуцирующие протоперитециев (мужские) или не способные оплодотворять их (женские). Рекомбинантное потомство может быть обоеполым или мутантным по обоим генам, т.е. стерильным. Такой гетероталлизм несбалансирован, поскольку в потомстве наряду с гетероталлическими (самонесовместимыми) родительскими типами встречаются гомоталлические (обоеполые) и стерильные (анаморфные) штаммы.

Физиологический гетероталлизм. Димиксис

Физиологический гетероталлизм представляет собой половой процесс «без пола», ибо скрещивающиеся штаммы не имеют морфологических различий и различаются лишь типом половых феромонов. Он встречается у грибов гораздо чаще морфологического. Наиболее простой и широко встречающийся — диаллельный, когда тип спаривания контролируется двумя аллелями одного локуса, причем слияние возможно только между индивидуумами, имеющими противоположные типы спаривания. Такой гетероталлизм называют *димиксисом*. Он встречается у грибов из всех классов. Многие из этих грибов имеют половые органы, однако гены, контролирующие образование гаметангиев и спаривание, могут быть различными, поэтому у обоеполых видов один и тот же штамм может быть как донором, так и акцептором ядер. Другие грибы, например мукооровые или дрожжи, не имеют половых органов.

Регуляция полового процесса у аскомицетных дрожжей

Жизненный цикл и переключения типов спаривания

В жизненном цикле дрожжей сахаромицетов преобладает диплоидная стадия. На богатых углеводами средах диплоидные дрожжи размножаются почкованием, а на обедненных (например, при замене сахара ацетатом натрия) происходит мейоз, продукты которого — 4 гаплоидные споры — освобождаются после разрыва оболочки материнской клетки и попарно копулируют, давая две диплоидные зиготы, которые размножаются вегетативно — почкованием. Если аскоспоры до слияния изолировать на отдельные питательные среды, то у одних природных штаммов будут вегетативно размножаться гаплоидные клетки, а у других — диплоидные. Первые штаммы, следовательно, гетероталлические, потомство их спор принадлежит к одному типу спаривания и не способно к слиянию. Вторые штаммы гомоталлические, поэтому клетки моноспорового потомства случайно сливаются попарно, восстанавливая диплоидное состояние.

У гетероталличных дрожжей на правом плече III хромосомы был картирован локус, ответственный за спаривание (*mat*-локус). Он имеет два аллеля — *a* и α , причем спариваться могут лишь клетки, имеющие разные аллели. Поэтому диплоидные штаммы гетерозиготны по локусу спаривания, а при мейозе происходит расщепление $2a \rightarrow 2\alpha$. У гомоталличных видов, естественно, расщепления нет, ибо все потомки диплоидны (4Д — 0Г). Однако часто встречались промежуточные между гомо- и гетероталличными формы. У некоторых штаммов наблюдалось расщепление $2Д \rightarrow 2a$, т. е. две споры гомоталличны (их потомство диплоидно), а две — гетероталличны, дают гаплоидное потомство, которое в скрещиваниях ведет себя как *a*. Другие штаммы давали расщепление $2Д \rightarrow 2\alpha$. Эти данные вызвали большое внимание к исследованию структуры *mat*-локуса. Определенный вклад в понимание его структуры внесли работы Г. И. Наумова.

Было показано, что на III хромосоме наряду с *mat*-локусом находятся еще два локуса (кассеты), играющие роль в диплоидизации. На правом плече дистальнее *mat*-локуса лежит кассета, названная HMR, а на левом плече — кассета HML. Участки ДНК в этих кассетах гомологичны MAT-ДНК, но вследствие наличия негативного регулятора транскрипции SIR (см. стр. 164) они не экспрессируются. Однако информация из кассет может заменять информацию, находящуюся в локусе спаривания. Если, допустим, гаплоидный штамм содержит информацию *mat*- α , а кассеты HMR — *a* и HML — α , то в какой-то клетке α -информация в *mat*-локусе может быть заменена *a*-информацией из кассеты HMR. Такая клетка будет спариваться с близлежащими α -клетками, в которых замены информации не было, и формировать диплоиды. Диплоидные штаммы, имеющие генотип a/α , HMR a , HML a , будут расщепляться на $2Д \rightarrow 2a$, ибо информация, находящаяся в локусе спаривания, может замещаться на *a*, но не на α .

В перемещениях информации из разных кассет в локус спаривания есть некоторая избирательность: α -клетки преимущественно получают информацию из кассеты HMR, тогда как *a*-клетки — из HML. Однако, если предпочтительный донор делетирован, неэффективный донор становится эффективным, то есть имеет место конкуренция кассет. В механизме, лежащем в основе выбора кассет, важную роль играет энхансер рекомбинации (RE), расположенный на левом плече третьей хромосомы, проксимальнее кассеты HML. Благодаря ему усиливается передача информации из кассеты HML в локус *mat*-*a*. В клетках, содержащих локус *mat*- α , RE инактивирован, и информация на всем протяжении левого плеча хромосомы, включая кассету HML, становится рекомбинационно неактивной. Поэтому переключение типа спаривания осуществляется преимущественно из правой кассеты.

Переключения осуществляются сайт-специфической эндонуклеазой, которая находится под контролем гена *HO*. Эндонуклеаза узнает определенный сайт в локусе спаривания, производит двунитевые разрывы ДНК (сайт-специфическую генную конверсию) и заменяет участок ДНК в *mat*-локусе на кассету. Переключение происходит медленно (в течение часа) и требует участия многих белков. Следовательно, кроме наличия определенной информации в кассетах на интерконверсию типов спаривания и диплоидизацию моноспоровых штаммов дрожжей влияет состояние локуса *HO* (в гомозиготах *ho/ho* эндонуклеаза не функционирует). Экспрессия гена *HO* находится под контролем нескольких *SWI*-генов, белковые продукты которых связываются с промотором *HO*-гена. Замена информации происходит перед репликацией ДНК, вследствие чего материнская и дочерняя клетки всегда переключаются попарно. В процессе делений переключения могут многократно повторяться.

Структура факторов спаривания

Структура факторов α и α показана на рис. 49. Как видно, они отличаются как по общей протяженности, так и по функциональной нагруженности. Поэтому по предложению Р. Мезенберга (1990) их называют не аллелями, а *идиоморфами*. Поскольку оба типа спаривания содержат по две дивергентно транскрибируемые рамки считывания, то последовательности α и α правильнее называть факторами, а не локусами или генами спаривания.

Факторы спаривания несут регуляторные функции. Транскрипт *MAT α 1* — позитивный регулятор экспрессии α -специфичных ге-

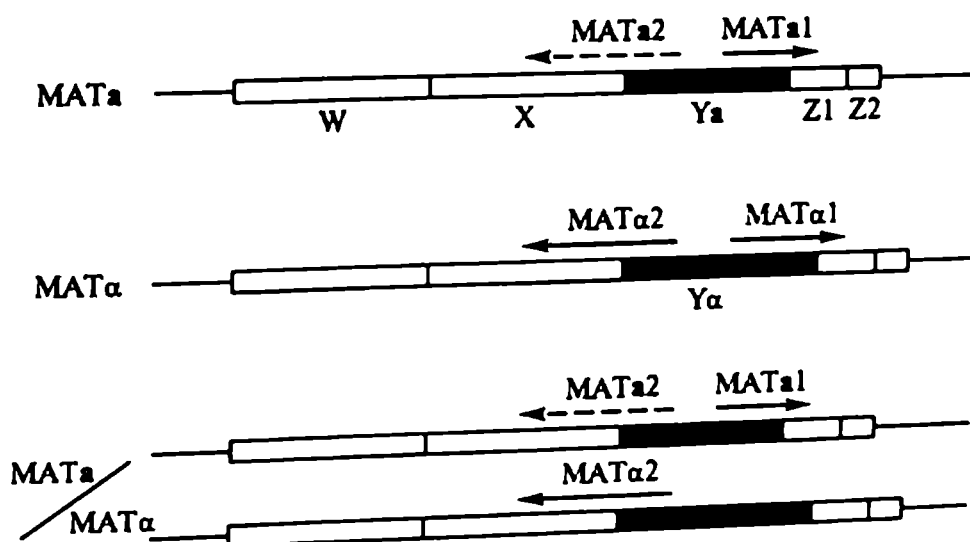


Рис. 49. Структура локусов спаривания *Saccharomyces cerevisiae*. Различаются участки *Ya* и *Ya* (размером 650 и 700 н. п. соответственно)

нов; при его соединении с активатором транскрипции Mcm1p эти гены активируются. Транскрипт MAT α 2 — негативный регулятор экспрессии α -специфичных генов, для чего также служит его соединение с белком Mcm1p. Следовательно, в α -клетках экспрессируются α -специфичные гены (вследствие индукции) и не экспрессируются α -специфичные (вследствие репрессии). Поэтому мутанты по гену α 1 стерильны, ибо в них вообще не экспрессируются гены, необходимые для спаривания. В α -клетках экспрессируются α -специфичные гены (вследствие отсутствия их репрессии) и не экспрессируются α -специфичные (вследствие отсутствия индукции). Следовательно, транскрипты MAT- α не принимают участия в регуляции метаболизма гаплоидных клеток.

Альфа- и α -специфичные гены и их продукты

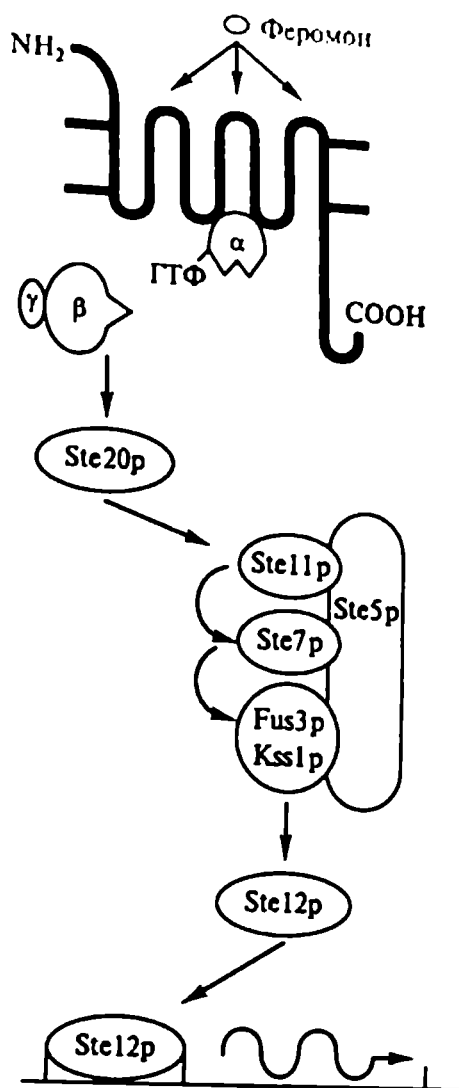
Альфа- и α -специфичные гены кодируют феромоны и рецепторы феромонов: α -клетки продуцируют α -феромоны и рецепторы α -феромонов; α -клетки продуцируют α -феромоны и рецепторы к α -феромонам.

Феромоны представляют собой олигопептиды, синтез которых находится под контролем двух пар генов (MF α 1, MF α 2, MF α 1, MF α 2). Феромон α , представляющий собой пептид из 13 аминокислот, образуется после протеолитического расщепления более длинных предшественников, гликозилируется и секретируется из клетки обычным путем в везикулах. Феромон α , 12-аминокислотный липопептид, имеет на аминотерминальном участке дополнительную аминокислотную последовательность, а на карбоксил-терминальном участке дополнительный мотив CaaX (C — цистеин, а — алифатическая аминокислота, X — одна из нескольких аминокислот). Через цистеин происходит соединение предшественника α -феромона с фарнезилем (пренилирование), после чего протекает серия событий, необходимых для прохождения через мембрану: прикрепление к мембране, удаление трех C-терминальных аминокислот, метилирование цистеина, ставшего терминальным, и удаление N-терминальной области предшественника. После этого феромон транспортируется наружу с помощью транспортного белка Steb, локализованного в клеточной мембране.

Рецепторы феромонов синтезируются под контролем генов STE (STE2 контролирует рецептор α -феромона, STE3 — α -феромона). Рецепторы феромонов принадлежат к большому семейству трансмембранных родопсиноподобных белков-рецепторов, имеющих короткий N-терминальный внеклеточный домен, семь трансмембранных гидрофобных α -спиралей, три внеклеточные и три внутриклеточные петли и длинный внутриклеточный C-терминальный хвост (рис. 50). Передача сигнала с рецептора осуществляет-

Рис. 50. Сигнальный путь индукции полового цикла у *Saccharomyces cerevisiae* (L. A. Casselton, N. S. Olesnický, 1998).

Феромон связывает внеклеточную петлю рецептора, после чего соединяется с α -субъединицей G-белка и освобождает β - и γ -субъединицы, которые активируют белок Ste20 — первую протеинкиназу MAP-киназного каскада. Последний фосфорилированный белок — Ste12 — является фактором регуляции транскрипции и связывается с промоторными участками многих генов



ся через гетеромерный (состоящий из α -, β - и γ - субъединиц) белок, соединенный с гуанином (G-белок). После соединения с феромоном конформация рецептора изменяется, и его внутриклеточные петли связываются с α -субъединицей G-белка. Субъединицы β - γ освобождаются и стимулируют каскадную активацию протеинкиназ, последовательно фосфорилирующих белки. Первая киназа, фосфорилируемая активизированными субъединицами G-белка, — серинтреониновая киназа Ste20p. Она в свою очередь фосфорилирует каскад митогенактивирующих белков (MAP-киназ). MAP-киназы фосфорилируют активатор транскрипции белок Ste12p. Последствия этого заключаются в следующих важнейших изменениях клеточного метаболизма.

1. Протеолиз феромонов и инактивация рецепторов, которые становятся ненужными.
2. Арест клеточного цикла на стадии G_1 (для синхронизации партнеров) вследствие инактивации циклинов, необходимых для его запуска (см. гл. 4), белком FAR1 и прекращение почкования.
3. Изменение формы клеток: вместо сферических и эллипсоидных они становятся грушевидными, вытягиваясь навстречу друг другу. Продукт гена *ARF1* — белок Agf1p определяет место на клеточной стенке, которая здесь вытягивается в направлении градиента концентрации феромона. Поляризованный рост клетки осуществляется с помощью элемента цитоскелета актина (регулируется белком Cdc42p).

4. Синтез поверхностных агглютининов — гликопротеинов, обеспечивающих слипание контактирующих клеток. Агглютинин α представляет собой N-гликозилированный белок, состоящий из 650 аминокислот, a -агглютинин — гликопротеин из 87 аминокислот.

5. Синтез ферментов, обеспечивающих растворение клеточных стенок в местах контакта.

6. Миграция ядер навстречу друг другу и их слияние.

Таким образом, основные гены и их продукты, оперирующие в гаплоидных клетках и обеспечивающие их слияние, следующие:

$\alpha 1$ — индуктор α -специфичных генов;

НО — сайт-специфичная эндонуклеаза, обеспечивающая переключение типов спаривания;

Mfa и Mfa — феромоны;

$Ste2$ и $Ste3$ — рецепторы феромонов;

$Ste5$ — фактор слияния клеток;

KAR1 — фактор слияния ядер.

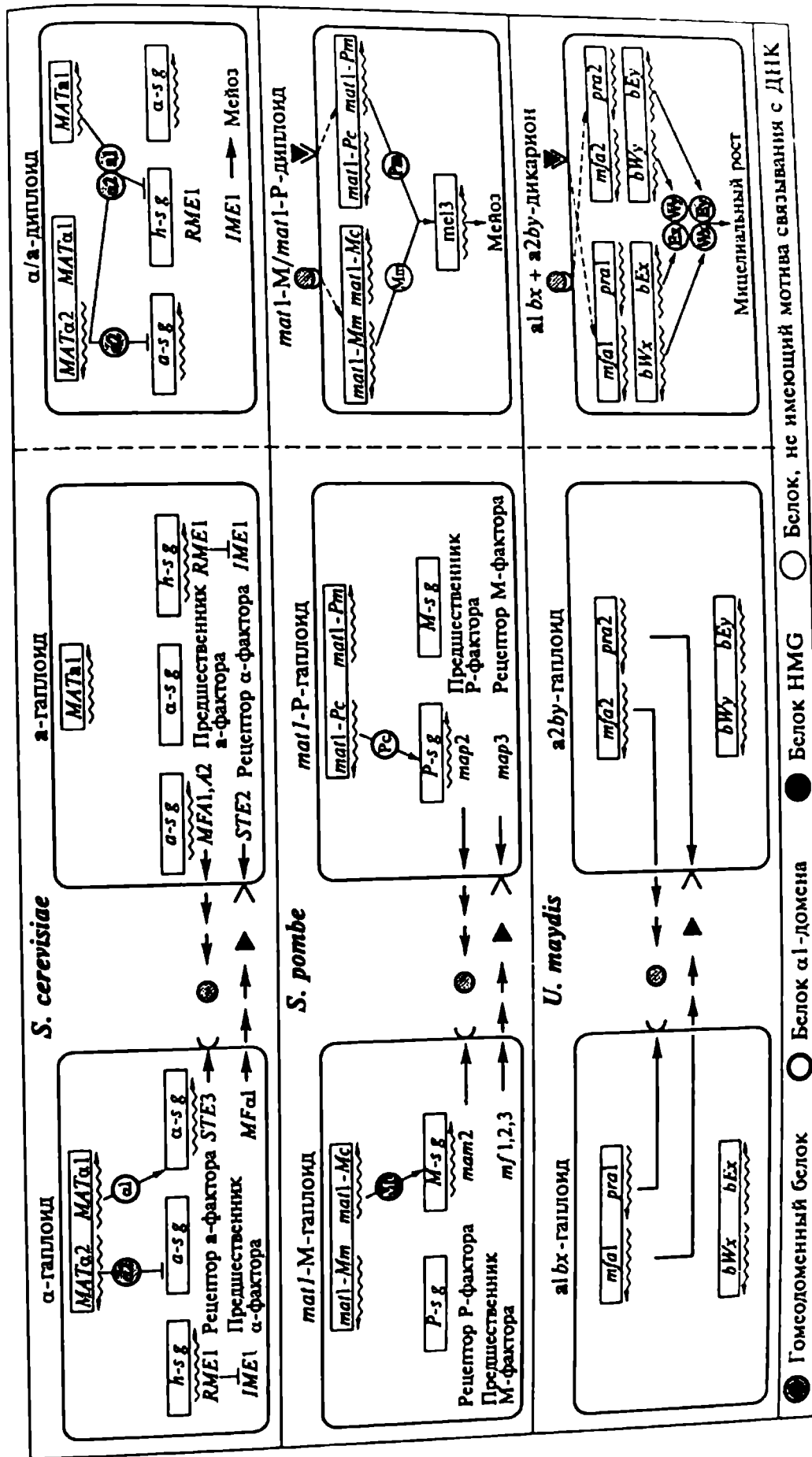
Гены и их продукты, функционирующие в диплоидных клетках

В диплоидных (α/a) клетках должна быть блокирована экспрессия феромонов, их рецепторов, НО-эндонуклеазы и должны активироваться гены, ответственные за клеточный цикл, мейоз и споруляцию (экспрессия двух последних индуцируется голоданием). Регулятором этих изменений является гетеродимер, образующийся вследствие объединения белков a и α . Гетеродимер *mata1/mata2* выполняет роль репрессора транскрипции, который вместе с факторами общей репрессии транскрипции Tup1p и Ssn6p формирует репрессорный комплекс, подавляющий активность гаплоидно-специфичных генов. В результате этого экспрессируются гены клеточного цикла, описанные в гл. 4.

Сходная структура факторов спаривания и их переключения, а также механизмов совместимости описана у делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* (рис. 51).

Рис. 51. Функциональные модели факторов спаривания у дрожжей из разных таксонов — аскомицетов *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* и базидиомицета *Ustilago maydis* (E. Coppin et al., 1997).

Волнистыми линиями указана экспрессия генов. Линии, заканчивающиеся поперечной полоской, показывают ингибирование экспрессии генов, а линии, заканчивающиеся стрелкой, — на активацию. Пунктирными стрелками показана непрямая активация экспрессии генов, вызванная сигналом феромонов. *a-sg*, α -*sg* и *h-sg* — a , α и гаплоид-специфичные гены *S. cerevisiae*; *M-sg* и *P-sg* — гены, специфически экспрессирующиеся в М- и Р- клетках *S. pombe*; *RME1* и *IME1* — репрессор и индуктор мейоза. В кружочках — домены кодируемых белков: белки с гомеодоменами, белки с $\alpha 1$ -доменами, белки с HMG-доменами (высокомолекулярные группы) и белки, не имеющие мотива связывания с ДНК



Локусы спаривания

В отличие от дрожжей у мицелиальных аскомицетов не установлено переключение факторов спаривания. Спаривание гетероталлических видов инициируется узнаванием под воздействием феромонов рецептивной гифой (трихогиной) штамма, имеющего противоположный тип спаривания. Трихогина сливается с мужской гаметой (конидией) или гифой, после чего происходят морфогенетические изменения, приводящие в конечном счете к образованию сумок с аскоспорами (рис. 52). Структура факторов спаривания исследована у нескольких аскомицетов, из которых мы рассмотрим пиреномицеты *Neurospora crassa* и *Podospira anserina* и локулоаскомицет *Cochliobolus heterostrophus*.

У *Neurospora crassa* на первой хромосоме находится МАТ-фактор, включающий две идиоморфы, не гомологичные по протяженности и последовательности нуклеотидов. Протяженность фактора А составляет 5,3 тыс. н.п., фактора а — 3,2 тыс. н.п. В митозе происходит спаривание по всей длине хромосомы, кроме области МАТ-фактора, где хромосомы не конъюгируют. Фактор А содержит три гена: *mat A-1*, *mat A-2* и *mat A-3*, фактор а — один ген *mat a-1*.

Фактор спаривания *Podospira anserina* также имеет две идиоморфы: *mat(+)* протяженностью 3,8 тыс. н.п. включает один ген FPR1, *mat(-)* протяженностью 4,7 тыс. н.п. — три гена FMR1, SMR1 и SMR2.

У *Cochliobolus heterostrophus* каждая идиоморфа включает по одному гену: МАТ-1 (1,3 тыс. н.п.) и МАТ-2 (1,2 тыс. н.п.).

Гены спаривания этих видов имеют большие области гомологии и сходны функционально (рис. 53). В частности, кроме узнавания на уровне клеток (сливаются только гетероаллельные по локусу спаривания гаметы или гаметангии), осуществляемого взаимодействием феромонов и рецепторов, у мицелиальных аскомицетов необходимо узнавание на уровне ядер (синхронизация делений и миграция гетероаллельных ядер дикарионов в многоядерных клетках и последующее их слияние). Гены *N.crassa* и *P.anserina* *mat a-1*, FPR1 и *mat A-1*, FMR1 необходимы для оплодотворения, а гены *mat A-2*, SMR1 и *mat A-3*, SMR2 — для последующего развития оплодотворенного перитеция, включая ядерное узнавание. Мутация *N. crassa* по гену *pre-1* (рецептор феромонов) лишала штаммы с типом спаривания *matA* способности оплодотворяться микроконидиями противоположного типа; следовательно, сигнал взаимодействия феромона и рецептора необходим не только для узнавания, но и для фертилизации.

Все кодируемые генами спаривания белки являются регуляторами транскрипции. В структуре кодируемых ими белков имеются

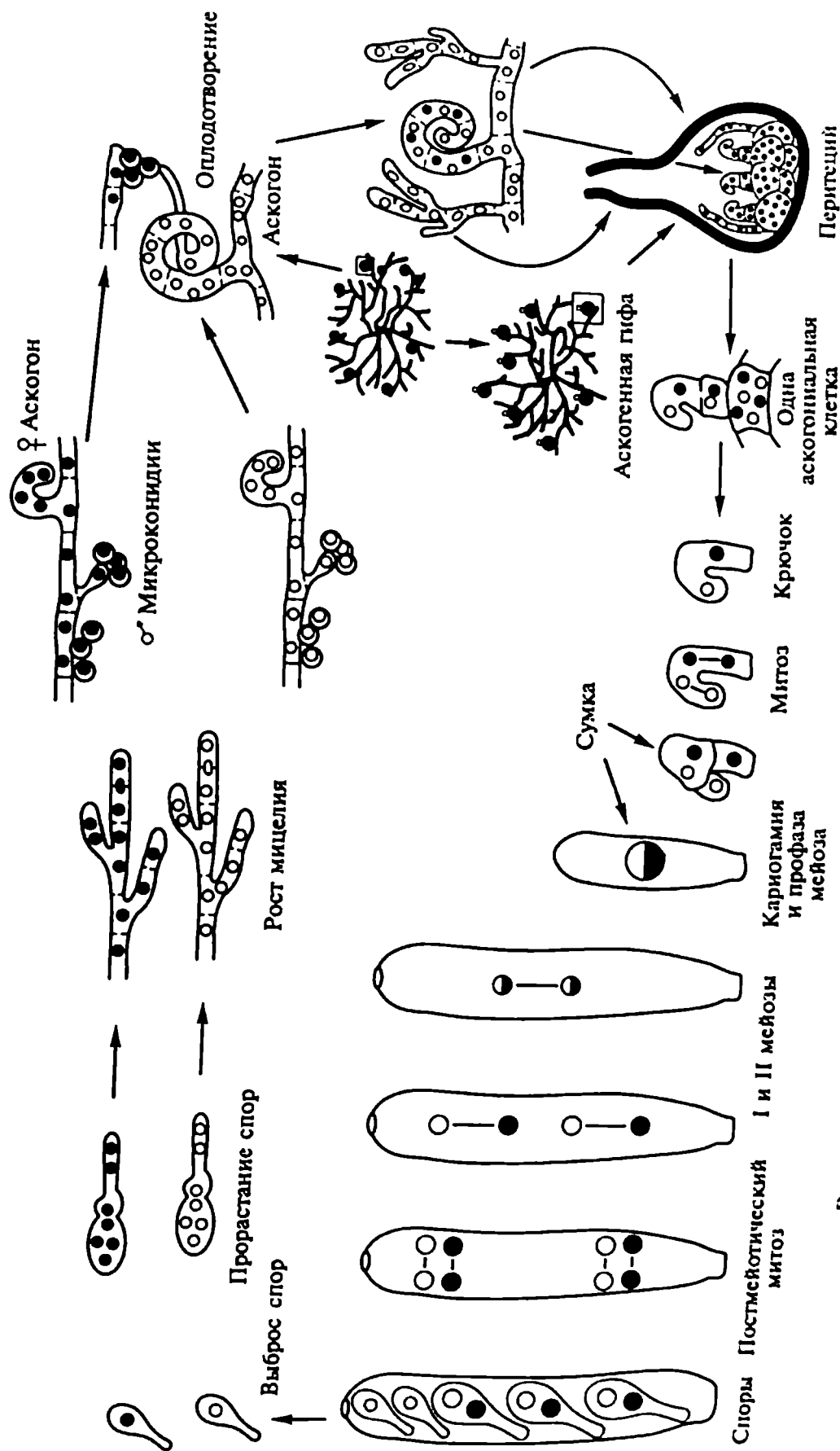


Рис. 52. Жизненный цикл гриба *Rodospora anserina* (E. Corrin et al., 1997)

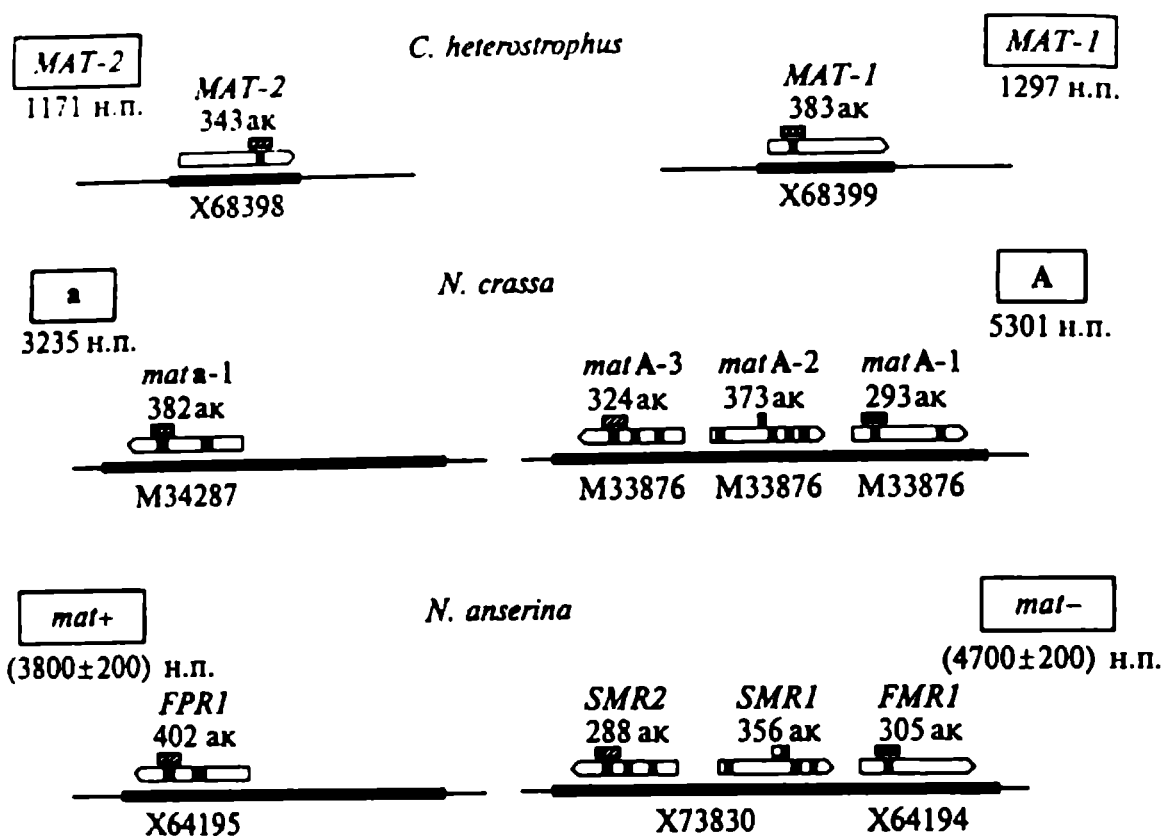


Рис. 53. Структура факторов спаривания трех сумчатых грибов — локуло-аскомицета *Cochliobolus heterostrophus* и пиреномицетов *Neurospora crassa* и *Podospora anserine* (Е.Сoppin et al. 1997).

Жирной линией обозначены участки с уникальными последовательностями (идиоморфы). Их протяженность, измеряемая числом нуклеотидных пар (н.п.) приведена справа и слева. Стрелками обозначены кодирующие последовательности идентифицированных генов, а черными полосками внутри — интроны. Под символом каждого гена показана длина кодируемого белка в числе аминокислот (ак)

определенные последовательности (мотивы), обеспечивающие связывание с ДНК (табл. 17).

Высокомобильная группа HMG (high mobility group) найдена у многих белков — регуляторов транскрипции, включая половой фактор, кодируемый геном SRV, который расположен на V хро-

Таблица 17. *MAT*-гены мицелиальных аскомицетов (В.Тurgeon, 1998)

Идиоморфы	Виды грибов и гены в составе <i>mat</i> -локусов			ДНК-связывающий мотив белка
	<i>C. heterostrophus</i>	<i>N. crassa</i>	<i>P. anserina</i>	
1	<i>MAT-1</i>	<i>MatA-1</i> <i>MatA-2</i> <i>MatA-3</i>	FMR1 SMR1 SMR2	α-бокс α-спираль HMG
2	<i>MAT-2</i>	<i>Mata-1</i>	FPR1	HMG

Генетическая регуляция плодообразования

Плодообразование у аскомицетов контролируется многими факторами — морфогенами, регулирующими морфогенез плодовых тел, липидами, стимулирующими половую репродукцию, ферментами фенолоксидазами (*o*-дифенолоксидоредуктазой — тирозиназой и *p*-дифенолоксидоредуктазой — лакказой), а также факторами внешней среды — светом, голоданием и др. По-видимому, на формирование плодовых тел оказывают влияние гидрофобины — низкомолекулярные гидрофобные белки, откладывающиеся на поверхности. Так, гидрофобин крипарин, найденный в клеточных стенках плодовых тел возбудителя рака каштанов *Criphonectria parasitica*, необходим для прохождения плодовыми телами твердой древесной коры. Не удивительно, что описано огромное число неидентичных мутаций, влияющих на плодообразование у многих аскомицетов. Например, ген *wc* (white color) *N.crassa* и ген *pall* *Gibberella zeae* влияют на синтез фенолоксидаз. Мутации по первому гену приводят к отсутствию перитециев, а по второму — к появлению желтых (вместо черных) стерильных перитециев. Кроме того, большое число генов влияет на процессы кариогамии, мейоза, формирование аскоспор и их расположение в аске. Данные по *Neurospora* показаны в табл. 18.

У *Podospora anserina* получено около 30 мутаций, влияющих на поведение ядер в аскогенных гифах и асках. Мутации гена *ami1*

Таблица 18. Мутации *N. crassa*, нарушающие мейоз

Локус	Локализация	Фенотип
<i>mei-1</i> <i>mei-2</i>	IV R (рецессивная) V R (доминантная)	Нет полноценного синаптонемного комплекса (только аксиальные элементы) — дефект по спариванию хромосом; 70—90 % спор белые, нежизнеспособные, вследствие нерасхождения в первом делении часты дисомии
<i>mei-3</i>	I L (рецессивная)	Блокирует зиготену
<i>mei-4</i> <i>fsp</i>	III R II	Подавляют второе деление, вследствие чего формируются 4-споровые аски
<i>peak</i>		Шаровидные (неупорядоченные) аски с 8 нелинейно расположенными спорами (нарушение ориентации веретена)

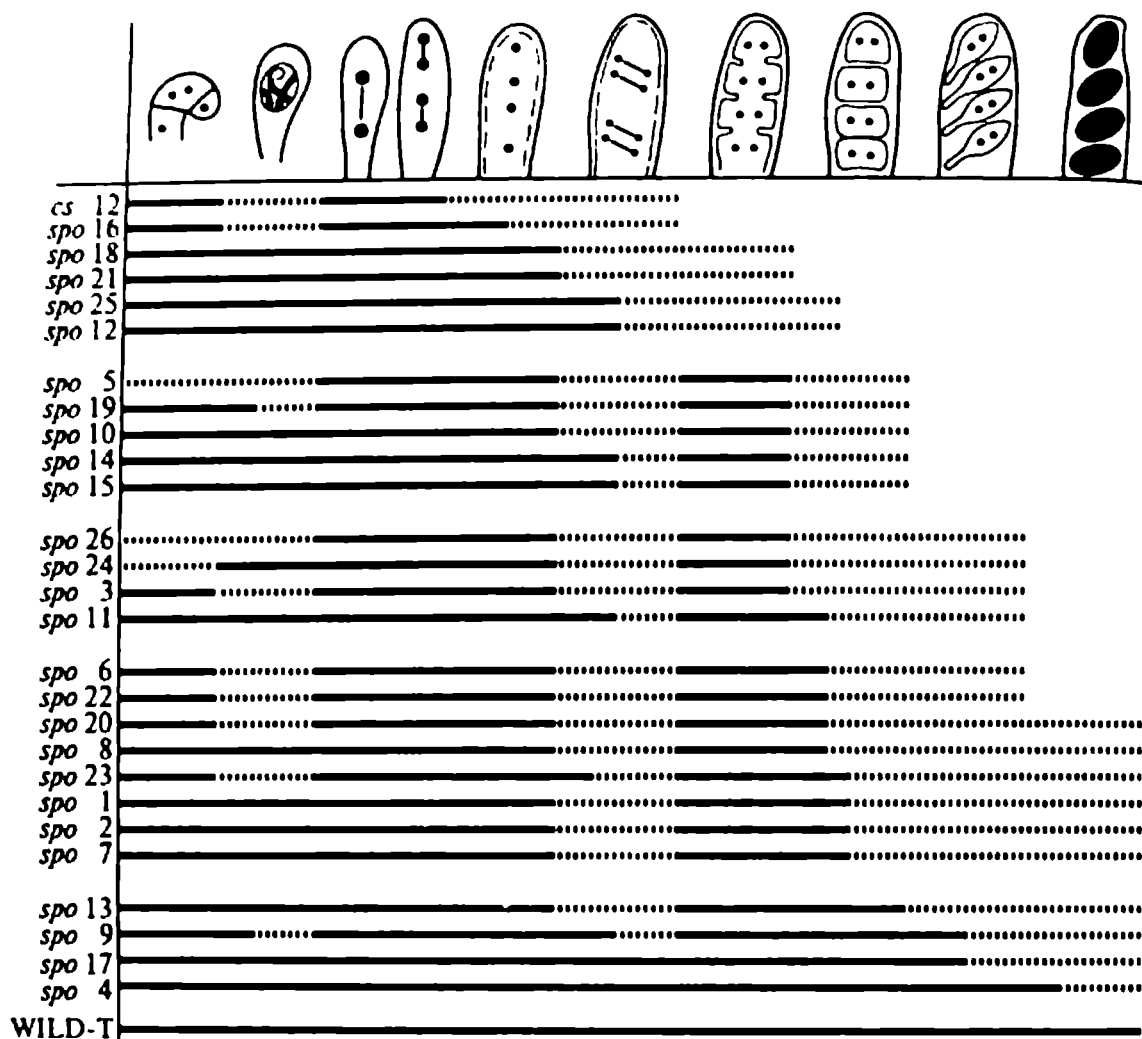


Рис. 54. Блокирование разных этапов аскоспорогенеза у 26 мутантов *Podospora anserina* (E. Zickler, 1980).

Сплошной чертой показано нормальное прохождение этапов, пунктирной — ненормальное. В колонке слева — символы мутантов (WILD — дикий тип). Рисунки сверху — последовательные этапы конидиогенеза: крючок, пахитена, первое и второе мейотические деления, формирование аскоспоровой мембраны, постмейотический митоз, вращение аскоспоровой мембраны с одновременной миграцией ядер, разделение аскоспор, созревание аскоспор, сумка с зрелыми аскоспорами

приводят к мужской стерильности (ядра не мигрирует из конидиеносца в микроконидию, служащую мужской гаметой), нарушениям миграции ядер в аскогенных гифах, формированию одноклеточных клеток крючка (вместо двухъядерных), неспособности к самооплодотворению. Этот ген имеет 42 % последовательностей ДНК, гомологичных *apsA*-гену *A. nidulans*, также регулирующему миграцию ядра в конидию. Ген *cro1* необходим для образования перегородки, отделяющей вершину крючка аскогенной гифы от основания и кончика. У мутантов по этому гену сливаются не два, а большее число ядер с последующими нарушениями мейоза и

образованием стерильных асков. У мутантов по гену *car1* не сливаются ядра в верхушке крючка, поэтому диплоидные ядра не образуются. На процессы диплоидизации, мейоза и формирования спор влияют 27 *spo*-мутантов (рис. 54).

Диафоромиксис

Классическая генетика

Диафоромиксис встречается только у базидиомицетов из порядков *Arhyllophorales*, *Agaricales*, *Nidulariales*, *Ustilaginales*. Все эти грибы имеют некоторые общие черты.

1. Отсутствуют специальные половые структуры. При половом процессе происходит слияние вегетативных гиф или гаплоидных базидиоспор.

2. Размножение в природе исключительно или почти исключительно половое; даже при наличии вегетативного размножения половой процесс обязателен в жизненном цикле.

3. Сложная система генетической регуляции полового процесса.

Обычно для этих грибов употребляют введенные немецким микологом А. Книппом понятия о биполярном и тетраполярном гетероталлизме, подразумевая под первым два аллельных состояния одного гена (аналогично мукоровым грибам или рассмотренным выше аскомицетам), а под вторым — два состояния двух несцепленных генов. Однако главное отличие высших базидиомицетов от ранее рассмотренных групп грибов заключается в том, что они имеют более двух аллельных состояний генов, контролирующих половую совместимость. Поэтому корректнее говорить не о би- и тетраполярном, а об одно- и двухфакторном гетероталлизме, подразумевая под первым наличие многих состояний одного фактора совместимости, а под вторым — много состояний двух факторов. Различия между ними заключаются в том, что при однофакториальной системе максимум инбредности (совместимых скрещиваний между сибсами — спорами из одного плодового тела) теоретически составляет 50 % (все потомки имеют факторы *Ax* или *Ay*), а при бифакториальной — 25 % (базидиоспоры имеют факторы *AxBx*, *AxBy*, *AyBx* и *AyBy*).

Однофакториальная система у высших базидиомицетов всегда многоаллельна. Так, у *Piptoporus betulinus* в природе найдено 28 аллелей фактора совместимости, у *Polyporus palustris* — 20, а у *Fomes cajanderi* — 33. У головневых грибов встречается как монофакториальный димиксис (например, аллели *a1* и *a2* у *Ustilago violacea*), так и диафоромиксис (у *Tilletia indica* монофакториальный, у *Ustilago maydis* бифакториальный).

Генетика и физиология бифакториального гетероталлизма подробно изучена у *Schizophyllum commune*. В генетические исследования этот вид был введен немецким микологом А. Книппом. Он установил, что за половой процесс ответственны два несцепленных фактора — *A* и *B*, имеющие множество аллелей. В простейшем случае можно иметь 4 сочетания этих факторов в потомстве одного плодового тела: *AxBx*, *AxBu*, *AyBx* и *AyBu*. Согласно правилу Книппа ни один из аллелей не может формировать после кариогамии гомозиготу (*AxAx* или *BxBx*). Таким образом, из шести возможных сочетаний факторов совместимости к кариогамии могут привести лишь два — *AxBx* × *AyBu* и *AxBu* × *AyBx*.

После анастомозов между монокариотическими (с одноядерными клетками) гифами, имеющими разные аллели факторов спаривания *A* и *B*, ядра мигрируют в соседние клетки. Как установил Дж. Рэйпер, ядра из разных гиф мигрируют в противоположных направлениях. Скорость миграции зависит от температуры (при 23 °С — 1 мкм/ч, а при 33 °С — 6 мкм/ч). Миграция ядер требует растворения или разрыва парентосом, окружающих сложные по структуре долипоровые септы. Мигрирующие ядра из каждой гифы достигают апикальной клетки противоположного мицелия, где объединяются в гетерокариотическую (дикариотическую) ассоциацию с ядром, находящимся в ней. Затем начинается серия морфогенетических изменений, включающая формирование выроста апикальной клетки (крючка, или *пряжки*), синхронное деление ядер дикариона, образование септы и миграцию несестринского ядра в субапикальную клетку с формированием дикариона. Многократное повторение этого процесса приводит к замещению гомокариотических (монокариотических) гиф гетерокариотическими (дикариотическими). Последние формируют более мощный, часто многолетний, мицелий с плодовыми телами.

Для изучения влияния факторов спаривания на морфогенетические процессы Дж. Рэйпер провел скрещивание гиф, имеющих разные комбинации:

- 1) $A \neq B \neq$ (совместимые);
- 2) $A \neq B =$
- 3) $A = B \neq$ } (полусовместимые);
- 4) $A = B$ (несовместимые).

Результаты скрещиваний показаны на рис. 55.

Таким образом, полный морфогенез требует различий по факторам *A* и *B*. При общих факторах *A* и *B* морфогенез не протекает; хотя гетерокарионы получить можно, они ограничены только анастомозирующими клетками и морфологически не отличаются от гомокарионов. При наличии разных факторов *B* и одинаковых *A* ($A = B \neq$) ядра нормально мигрируют до апикальной клетки, но

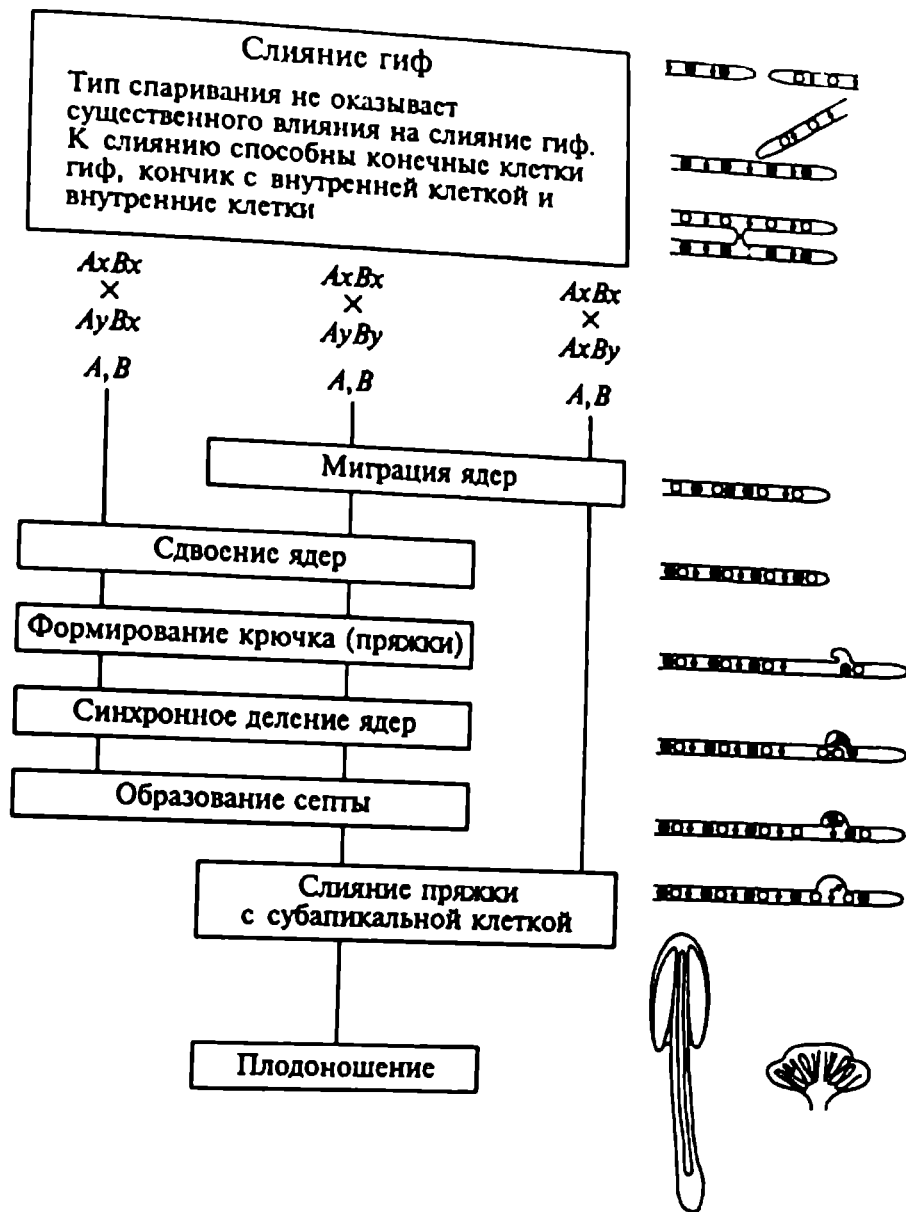


Рис. 55. Влияние факторов спаривания A и B на морфогенез *Schizophyllum commune* (по D. Moor, 1998).

Тип спаривания не оказывает влияния на слияние гиф, которое происходит независимо от факторов спаривания взаимодействующих гиф. Возможно слияние конечных клеток гиф и кончика с одной или несколькими внутренними клетками $A = B = A = B = A = B =$

далее никаких морфогенетических процессов не происходит. Различие по фактору B приводит к разобщению энергии метаболизма, поэтому гетерокарион $A = B \neq$ медленно растет, септы между клетками мицелия разрываются, выдавливая капельки протопластов. Такой фенотип назван *flat* (F).

При различии партнеров по фактору A ($A \neq B =$) не происходит ядерной миграции, вследствие чего часть морфогенетических изменений (образование пряжки, синхронное деление ядер, фор-

мирование септы) протекает в первичных анастомозировавших клетках, однако пряжка не сливается с примыкающей клеткой. Гетерокарион в этом случае ограничен двухъядерными слившимися клетками с пряжками, остальные клетки остаются одноядерными. Такой гетерокарион нестабилен и распадается на исходные гомокарионы, если его не поддерживать на селективных средах.

Из этих данных можно сделать вывод, что *A* и *B* являются регуляторными генами, которые включают экспрессию серии структурных генов. Фактор *B* регулирует растворение парентосом долипоровых септ и миграцию ядер, а фактор *A* — последующий морфогенез.

Если из спорового порошка, осыпавшегося с одного плодового тела, выделить 10—15 моноспоровых изолятов и провести скрещивания каждого изолята со всеми остальными (10 × 10 или 15 × 15), то можно получить матрицу, в которой по наличию пряжек располагают совместимые комбинации ($A \neq B \neq$), а по фенотипу *flat* — одну из полусовместимых ($A = B \neq$). Анализ матрицы позволит выделить 4 тестера типов спаривания ($AxVx$, $AyVx$, $AxBu$, $AyBu$), с помощью которых можно определить факторы спаривания других штаммов того же вида, т. е. изучать пространственное распределение отдельных индивидуумов в природе, популяционное разнообразие и другие показатели (табл. 19).

Таким образом, если оба фактора тестерных штаммов, выделенных из двух плодовых тел, одинаковы, то из 16 гибридных комбинаций (скрещивания 4 × 4) только 4 (25 %) совместимы; если различаются оба фактора, то совместимыми окажутся все 16 комбинаций. При различиях по одному из факторов наблюда-

Таблица 19. Определение типов спаривания у штаммов высших базидиомицетов

Неизвестный штамм	Типы спаривания тестерных штаммов				Тип спаривания неизвестного штамма
	$AxVx$	$AxBu$	$AyVx$	$AyBu$	
1	—	<i>F</i>	—	+	$AxVx$
2	<i>F</i>	—	+	—	$AxBu$
3	—	+	—	<i>F</i>	$AyVx$
4	+	—	<i>F</i>	—	$AyBu$
5	+	—	+	—	$AzBu$
6	+	+	+	+	$AzBz$

Таблица 20. Типы спаривания тестеров у двухфакторных грибов
(E. Williams, K. Todd, 1985)

Общие аллели	Тестеры 2-го дикариона	Тестеры 1-го дикариона:				Число совместимых комбинаций
		A1B1	A2B2	A1B2	A2B1	
0	A3B3 A4B4 A3B4 A4B3	+	+	+	+	16
		+	+	+	+	
		+	+	+	+	
		+	+	+	+	
1 (A или B)	A3B3 A1B4 A3B4 A1B3	+	+	+	+	12
		—	+	—	+	
		+	+	+	+	
		—	+	—	+	
2 (оба A или оба B)	A1B3 A2B4 A1B4 A2B3	—	+	—	+	8
		+	—	+	—	
		—	+	—	—	
		+	—	+	—	
2 (A и B)	A3B3 A1B1 A1B3 A3B1	+	+	+	+	9
		—	+	—	—	
		—	+	—	+	
		—	+	+	—	
3	A1B1 A1B3 A2B1 A2B3	—	+	—	—	6
		—	+	—	+	
		—	—	+	—	
		+	—	+	—	
4	A1B1 A2B2 A1B2 A2B1	—	+	—	—	4
		+	—	—	—	
		—	—	—	+	
		—	—	+	—	

ются промежуточные соотношения совместимых и несовместимых скрещиваний (табл. 20).

Оценку типов спаривания неизвестных штаммов могут облегчить предложенные А. Буллером ди-мон-скрещивания, при которых с выделенными монокариотическими тестерами одного изолята скрещивают не монокариотические тестеры другого изолята, а его дикариотический мицелий. При таких скрещиваниях ядра из дикариотического мицелия мигрируют в монокариотический и регулируют морфогенез в нем. Возможны следующие случаи ди-мон-кроссов:

- *совместимость*, или полный морфогенез: $(A_xV_x \text{ и } A_yV_y) \times A_zV_z$ — нет общих факторов;
- *полусовместимость*, или неполный морфогенез: $(A_xV_x \text{ и } A_yV_y) \times A_xV_x$ — общие факторы монокариона и одного ядра дикариона;

• *несовместимость* или отсутствие морфогенеза: ($AxVx$ и $AyVy$) $\times$ $AxVy$ — общие факторы в ядре монокариона и обоих ядрах дикариона.

Ди-мон-скрещивания в 4 раза уменьшают число необходимых кроссов по сравнению с мон-мон-скрещиваниями и не требуют выделения дополнительных тестерных штаммов из изучаемых плодовых тел, однако такие скрещивания не всегда дают четкие результаты.

До сих пор речь шла не о *генах*, а о *факторах* несовместимости. Это обусловлено тем, что Папазян, а затем более детально Дж. Рэйпер описали сложную структуру факторов A и B *Schizophyllum commune*; каждый из факторов представлен двумя сцепленными локусами α и β , которые рекомбинируют. Такое же строение имеют факторы несовместимости и у некоторых других тетраполярных базидиомицетов. Таким образом, имеются 4 гена половой несовместимости — A_α , A_β , B_α и B_β . Каждый ген представлен серией аллелей. Для обеспечения половой совместимости необходимо, чтобы партнеры имели разные аллели хотя бы одного гена (например, $A_{\alpha 1} \beta_1$ скрещивается с $A_{\alpha 2} \beta_2$, $A_{\alpha 1} \beta_2$ и $A_{\alpha 2} \beta_1$, но не с $A_{\alpha 1} \beta_1$). При наличии большого числа аллелей каждого гена такая система обуславливает огромное число различных состояний факторов спаривания в природе, которое можно подсчитать, пользуясь формулой Добжанского — Райта:

$$P = 1/n + np^2,$$

где P — вероятность повторения фактора; n — число факторов; p^2 — вариантса.

Поскольку аллели факторов несовместимости встречаются в потомстве с одинаковой частотой, показатель np^2 очень мал, поэтому приближенно $P = 1/n$.

Пример расчетов. У биполярного трутового гриба *Poria carpegiae* из 18 плодовых тел, собранных в разных местах, выделено по 2 тестерных монокариона (Ax и Ay). Попарно скрестили друг с другом все 36 культур. В 630 комбинациях обнаружено 29 аллелей, из них 7 встречались более одного раза. Отсюда $P = 1/n = 7/630$, $n = 90$.

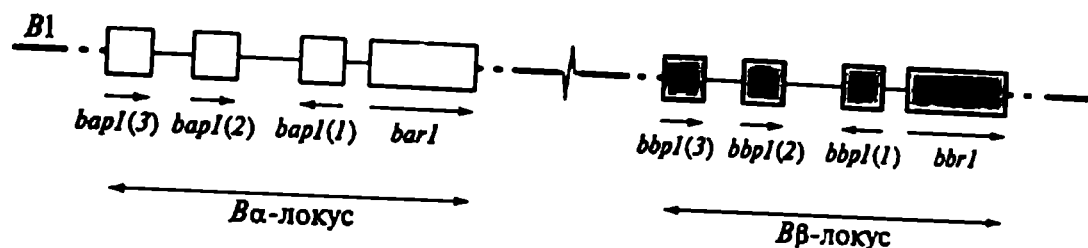
Молекулярная генетика

У некоторых видов базидиомицетов факторы спаривания были клонированы, что дало возможность исследовать структуру и функцию их продуктов. Рассмотрим результаты подобных исследований на примере трех видов грибов — сапротрофов со сложным морфогенезом и плодовыми телами — *Schizophyllum commune* (порядок Aphyllophorales) и *Coprinus cinereus* (порядок Agaricales), а также фитопатогена *Ustilago maydis* (порядок Ustilaginales) с простым в связи с паразитическим образом жизни морфогенезом.

Schizophyllum commune и *Coprinus cinereus*

В-фактор. У *S. commune*, как указывалось выше, В-фактор разделен на 2 локуса — α и β . Отсутствие самосовместимости у рекомбинантов свидетельствует о независимости информации, находящейся в α - и β -локусах (взаимодействуют генопродукты, контролируемые разными аллелями только α - или β -локусов). Молекулярное картирование подтвердило это заключение. В каждом локусе находится кассета, состоящая из трех генов, кодирующих феромоны (гены *bar 1-3*, *bpr 1-3*) и одного гена, кодирующего рецептор феромона (*bar*, *bbr*) (рис. 56). Феромоны из кассеты *B α* (*bar*) стимулируют активизацию рецептора, кодируемого аллельным геном *B α* (*bar*), но не стимулируют собственный *B α* -рецептор, а также любой рецептор из кассеты *B β* . По-

S. commune



C. cinereus

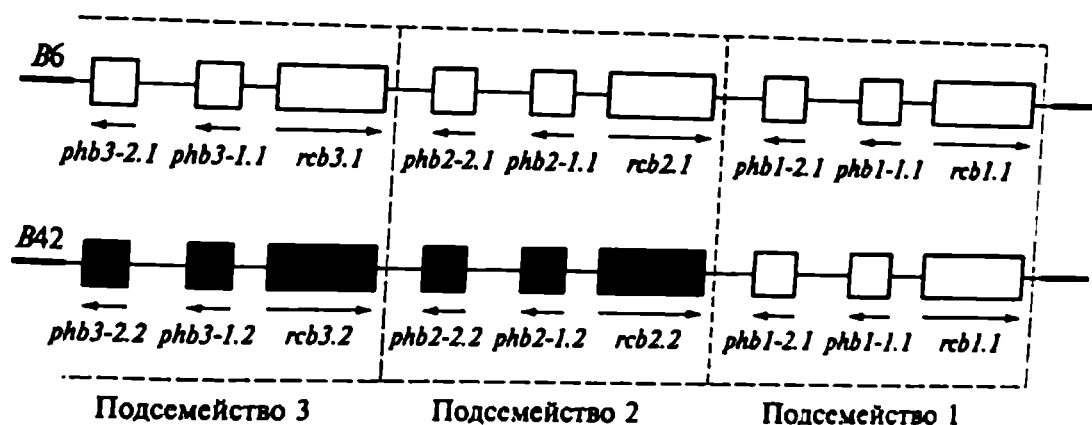


Рис. 56. Структура В-факторов *Schizophyllum commune* и *Coprinus cinereus* (L. A. Casselton, N. S. Olesnicky, 1998).

B α - и *B β* -подсемейства *S. commune* протяженностью около 8 тыс. н.п., содержат по 4 гена: три (квадраты) кодируют предшественников феромонов и один (прямоугольник) — рецептор. Гены каждого подсемейства функционально независимы. Расстояние между подсемействами α и β составляет около 3,5 единицы карты. В-фактор *C. cinereus* длиной 17 тыс. н.п. разделен на три функционально независимых подсемейства генов (2 гена феромонов и 1 ген рецептора). Показанные на рисунке факторы *B6* и *B42* кодируют различные аллели в подсемействах 2 и 3, а гены в подсемействе 1 одинаковые

добным образом происходит активизация рецепторов феромонов в каскаде *B β* .

В отличие от *S. commune* у *C. cinereus* *B*-фактор спаривания имеет не две, а три кассеты. Каждая кассета состоит из двух генов, кодирующих феромоны (*phb*-гены), и одного, кодирующего рецептор феромонов (*rcb*-гены) (рис. 56). Взаимодействие генопродуктов подчиняется тем же правилам: каждая кассета самодостаточна, причем взаимодействие осуществляется только при наличии разных аллельных состояний феромона и рецептора внутри любой кассеты (хотя бы одной).

Особенностью мицелиальных базидиомицетов является тот факт, что сигнальное действие феромонов инициируется только после слияния клеток, имеющих противоположный тип спаривания, т.е. феромоны нужны не для слияния, как у дрожжевых форм грибов, а для регуляции морфогенеза после слияния гиф. Комплементарные *B*-гены обеспечивают обмен и миграцию ядер. В конечной клетке под действием *A*-продуктов происходят спаривание ядер, синхронные деления, инициация образования пряжки. Формирование септы индуцируют *B*-продукты. Феромоны обоих видов образуются из белков-предшественников, имеющих одинаковый *C*-терминальный мотив — *СааХ*, необходимый для пренилирования (связывания с молекулой терпеноида), и после процессинга образующих молекулу феромона, состоящую из 9—15 аминокислот. Рецепторы феромонов *C. cinereus* содержат 7 трансмембранных доменов и гомологичны рецептору фактора *a* дрожжей *Saccharomyces cerevisia* (*Ste-3p*). Рецептор спарен с гетеромерным *G*-белком и передает внутриклеточный сигнал через каскад *МАР*-киназы, заканчивающийся индукцией морфогенетических генов.

***A*-фактор.** У обоих видов физически разделен на α - и β -локусы. У *C. cinereus* α -локус исходно имел одну (*a*), а β -локус — две (*b* и *d*) пары генов, названных *HD1* и *HD2* в каждой паре. У разных природных штаммов один из любой пары генов может быть утрачен (рис. 57), что несколько не отражается на способности к скрещиваниям и морфогенезу, ибо для протекания этих процессов необходимо взаимодействие продуктов любой пары аллельных генов (*HD1* и *HD2*), как показано стрелками на рисунке.

Гетеродимеризация белков *HD1* и *HD2* происходит вследствие перекручивания спиралей в сверхспирализованных областях α -спирали белка. Несмотря на низкий процент гомологии белков *HD1* и *HD2* одной группы (*a*, *b* или *d*), в *N*-терминальной области имеются последовательности, обеспечивающие димеризацию этих белков. У различных групп (*a*, *b* и *d*) эти *N*-терминальные специфичные области находятся в разных местах, что накладывает запрет на димеризацию белков из разных групп. Гетеродимеры являются факторами транскрипции, которые, связываясь

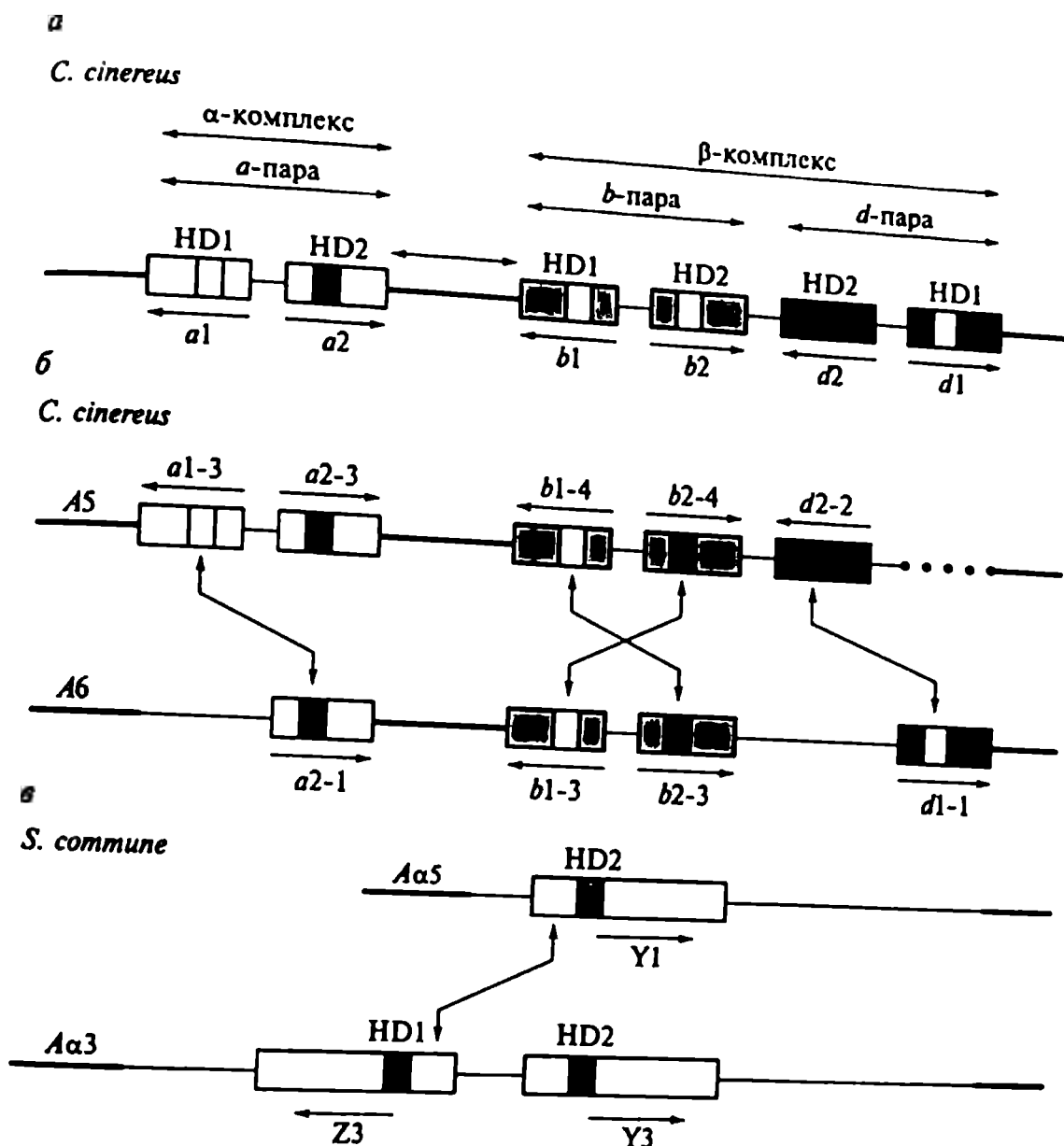


Рис. 57. Структура А-факторов *Schizophyllum commune* и *Coprinus cinereus* (L.A. Casselton, N.S. Olesnicky, 1998).

a — архетип фактора А *C. cinereus* содержит три пары дивергентно транскрибирующихся мультиаллельных генов (*a*, *b*, *c*). Гены каждой пары кодируют два различных белка с индивидуальным гомеодомениным мотивом — HD1 и HD2. Первый кодирует белок размером около 680 аминокислот, второй — около 520. *Толстая линия* — гомологичные последовательности, фланкирующие идиоморфы и разделяющие их (расстояние между α - и β -подсемействами — 7 тыс. н.п.). *Тонкая линия* — негомологичные участки ДНК, которые препятствуют рекомбинации между генами. Гомеодоменинные участки генов заштрихованы; **б** — организация факторов А5 и А6 *C. cinereus*. Образование гетеродимерных белков показано стрелками. Видно, что делетирование отдельных генов не препятствует формированию активных продуктов взаимодействия вследствие трехкратной взаимозаменяемости; **в** — А α -фактор *S. commune* включает одну пару дивергентно транскрибируемых мультиаллельных генов HD1 и HD2, названных соответственно Z и Y (кодируют белки из 890 и 930 аминокислот). Фактор А α 5 содержит только один ген, но взаимодействие кодируемого им белка HD2 с HD1-белком штамма, имеющего фактор А α 3, обеспечивает образование активного гетеродимера и протекание морфогенеза, регулируемого фактором А

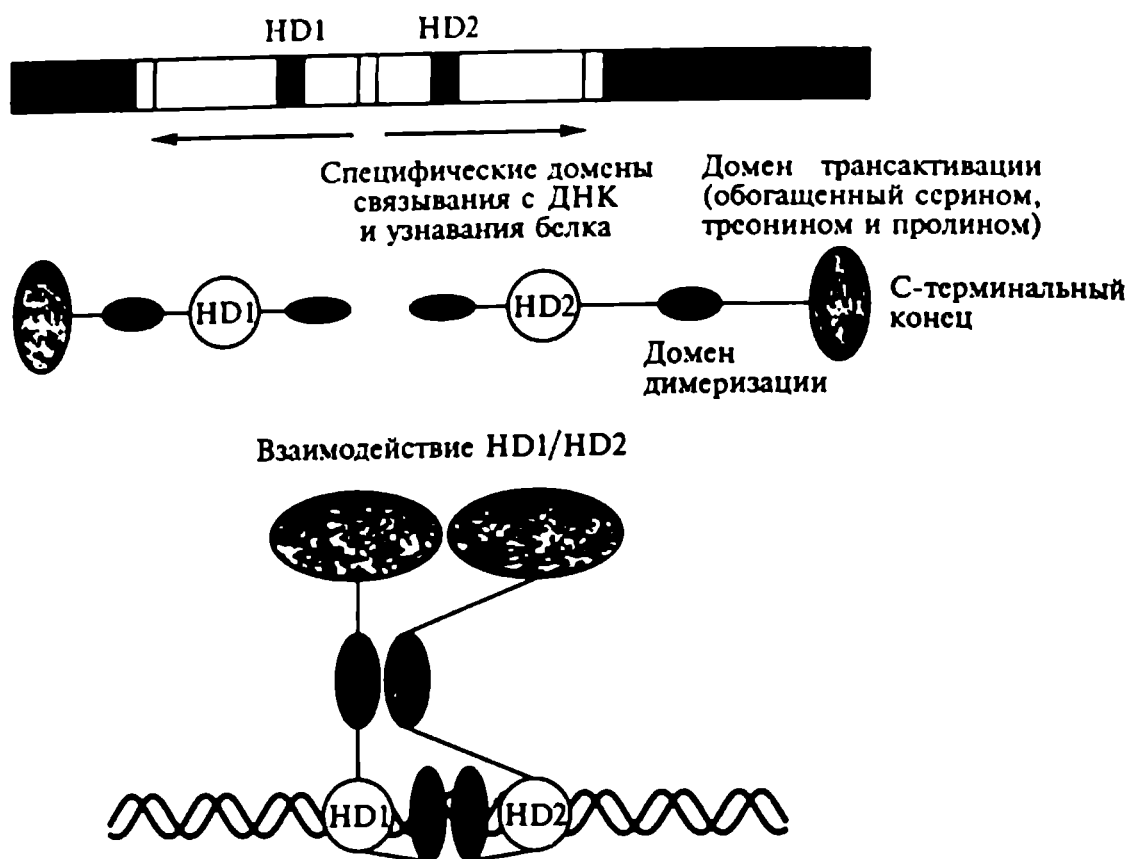


Рис. 58. Схема димеризации факторов HD1 и HD2 и взаимодействия гетеродимера с ДНК (по D. Moor, 1998)

с определенными участками ДНК, индуцируют экспрессию морфогенов. Сайты связывания с ДНК находятся в С-терминальной области (рис. 58).

Ustilago maydis

У возбудителя пузырчатой головни кукурузы *U. maydis* для прохождения полного цикла также необходимо слияние гаплоидных клеток, различающихся по факторам спаривания *a* и *b*. Головные грибы отличаются от вышеописанных холобазидиомицетов, во-первых, отсутствием сложных морфогенетических процессов, в том числе образования плодовых тел, во-вторых, мицелиально-дрожжевым диморфизмом (гаплофаза представлена почкующимися клетками, дикариофаза — мицелием) и, в-третьих, облигатно-паразитическим существованием в дикариофазае. Полный жизненный цикл у *U. maydis* протекает только при гетероаллельности обоих факторов. При $a = b =$ и $a = b \neq$ не происходит даже плазмогамии, гаплоидные базидиоспоры размножаются почкованием (отсутствуют мицелиальный рост и патогенность), т.е. наблюдается полная несовместимость. При $a \neq b =$ наблюдаются анасто-

мозы и обмены ядер, но образующийся гетерокарион не патогенен. Поэтому было высказано предположение, что фактор *a* отвечает за дикариотизацию, а фактор *b* — за патогенность.

Генетическая структура факторов *a* и *b* также отличается от вышеописанной. Фактор *a* представлен только двумя аллелями, т.е. он аналогичен половым факторам димиксных аскомицетов. Фактор *b* представлен несколькими десятками аллельных состояний, но, поскольку внутри *b*-фактора не обнаружено рекомбинаций при скрещиваниях, он имеет более простую структуру, чем *b*-факторы холобазидиомицетов.

Фактор *a* встречается в двух аллельных состояниях — *a1* и *a2* (рис. 59). Он обеспечивает слияние клеток и поддержание мицелиального роста, но не патогенность. Аллельные состояния — не гомологичные идиоморфы длиной 4,0 и 8,5 тыс. н. п. Каждая идиоморфа включает гены специфичных для клеточного типа феромонов (*mfa*) и рецепторов (*pra*): идиоморфа *a1* — *mfa1* и *pra1*, идиоморфа *a2* — *mfa2* и *pra2*; *mfa1* и *mfa2* кодируют пептиды, состоящие из 40 и 38 аминокислот с последовательностью СaaX (у *a1* — цистеин, валин, валин и аспарагин, у *a2* — цистеин, лизин, изолейцин, аспарагин). Как говорилось выше, мотив СaaX служит для пренилирования предшественника (связывания геранилом или фарнезиллом) при транспорте через мембрану. Зрелые молекулы *a1*- и *a2*-феромонов, образующиеся после процессинга, — липопептиды, содержащие 13 и 9 аминокислот соответственно.

Рецепторы феромонов *a1* и *a2* — белки из 357 и 346 аминокислот соответственно. Они содержат области гомологии рецептора феромонов других изученных базидиомицетов, а также рецептора α -фактора *Saccharomyces cerevisiae* и М-фактора *Schizosaccharomyces pombe*. Ген *pra1* кодирует рецептор для *a2*-феромона, ген *pra2* — рецептор для *a1*-феромона (см. рис. 51). Соединение феромона с рецептором приводит к диссоциации тримерного

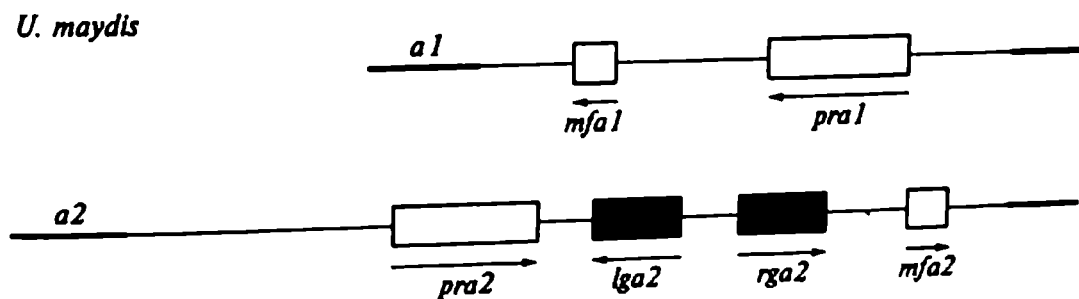


Рис. 59. Структура *a*-фактора *Ustilago maydis* (L. A. Casselton, N. S. Olesnický, 1998).

a1 содержит два гена — *mfa1*, кодирующий *a1* феромон, и *pra1*, кодирующий рецептор. Фактор *a2* содержит гены *mfa2* (кодирует феромон *a2*), *pra2* (кодирующий рецептор), а также гены *lga2* и *rga2* с неизвестными функциями

G-белка и трансдукции сигнала через каскад MAP-протеинкиназ. Один из путей трансдукции сигнала приводит к мицелиальному росту дикариона и формированию белого пушистого воздушного мицелия (фенотип *Fuz* — от англ. fuzz — пух). Регуляцию мицелиального роста осуществляет активатор MAP-киназы MEK, контролируемый геном *fuz-7*.

Фактор *b* содержит два гена, названные *bE* (east — восток) и *bW* (west — запад). Поскольку фактор *b* диафоромиксный (пред-

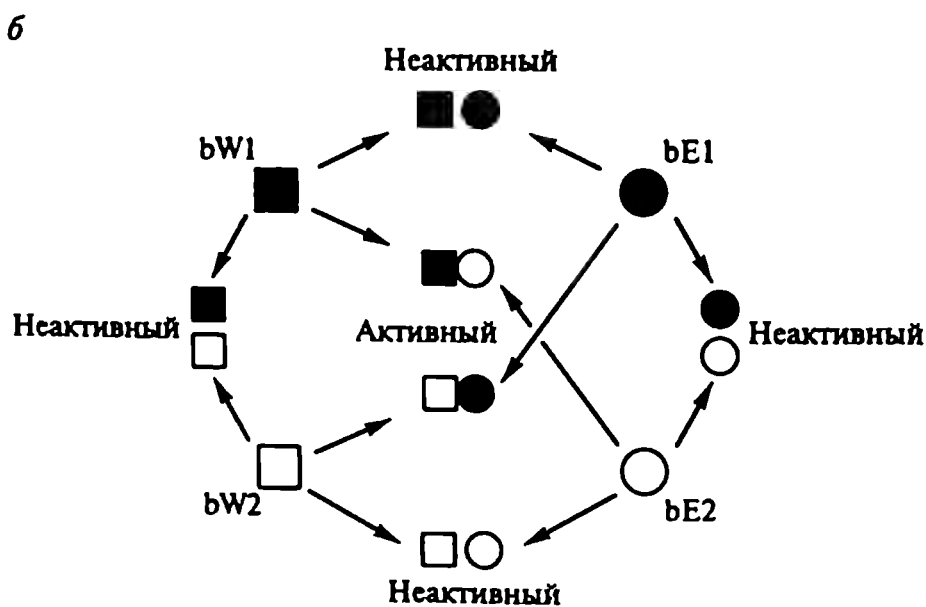
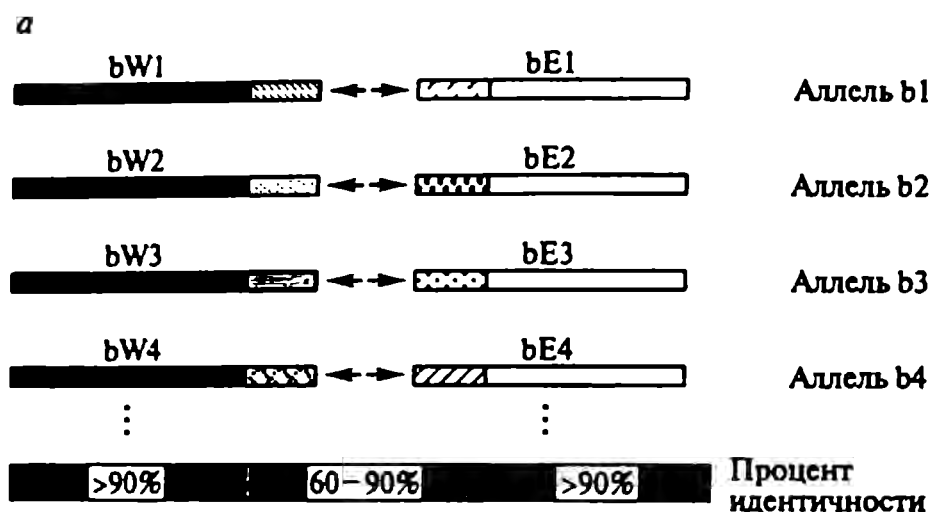


Рис. 60. Организация фактора *b* *Ustilago maydis* (E. Spelling et al., 1994).

а — структура различных аллелей. Последовательности ДНК, соответствующие терминальным областям белков бW и бE (константные области белков), имеют более 90% гомологии. Межгенный спейсер, содержащий промоторный участок дивергентно транскрибирующихся генов, и последовательности ДНК, кодирующие вариабельные N-терминальные области обоих белков, имеют 60–90% гомологии. Аллельно-специфичные области обозначены разной штриховкой; **б** — возможные комбинации генотипов бW и бE в совместимых скрещиваниях. Только две (в центре) из шести возможных комбинаций обеспечивают регуляцию развития

ставлен многими аллельными состояниями), кодируемые белки содержат вариабельный (в N-терминальной области) и константный (в C-терминальной) участки. В константной области находится мотив, свидетельствующий о регуляторной (связывающей с ДНК) функции белков. Эти белки активны только в форме гетеродимеров, причем белок bE1 не может димеризоваться с белком bW1 (рис. 60). В гетеродимерной форме эти белки регулируют мицелиальный рост, патогенность и формирование опухоли у зараженных растений.

Сравнение регуляторных функций двух видов аскомицетных и одного вида базидиомицетных дрожжей было показано на рис. 51. Их структурное и функциональное сходство свидетельствует о филогенетической близости аско- и базидиомицетов.

Генетическая регуляция плодообразования

В культуре некоторые высшие базидиомицеты (*Polyporus brumales*, *Agrocybe agerita* и др.) формируют плодовые тела на монокариотичном мицелии. Они более мелкие, чем дикариотичные, часто уродливые, построены из мицелия без пряжек, в базидиях не происходят кариогамия и мейоз. Однако факт их образования свидетельствует о наличии помимо факторов спаривания морфогенетических генов, регулирующих плодоношение. Тем не менее, хотя плодообразование не всегда коррелирует с половым циклом, оно находится под его контролем. При скрещивании друг с другом монокарионов, дающих плодовые тела, плодоношение наблюдается только при гетероаллельности гибридов по факторам A и B. Таким образом, факторы спаривания контролируют весь морфогенез от слияния вегетативных гиф до плодоношения.

Исследование плодоносящих в монокариотической фазе жизненного цикла мутантов *Agrocybbe agerita*, проведенное в лаборатории немецкого генетика К. Эссера, позволило выделить два гена, контролирующих формирование плодовых тел — *fi*⁺ и *fb*⁺. Первый необходим для формирования плодовых инициалей, второй — для образования зрелых плодовых тел. Кроме того, как показано в исследованиях, проведенных с грибом *Schizophyllum commune*, имеется ген *mod*⁺; его присутствие репрессирует программу развития плодовых тел, вместо которых образуются бесформенные скопления мицелия (рис. 61). Для образования нормальных дикариотических плодовых тел необходимо, чтобы хотя бы один партнер (лучше, если оба) имел активные аллели генов *fi* и *fb*. Плодовые тела *Coprinus cinereus* также проходят две стадии инициации. В темновую стадию формируются узелки первичных гиф в виде рыхлой сети. В темноте они превращаются в склеротий, а на свету агрегируют в шарики, в которых происходит дифференци-

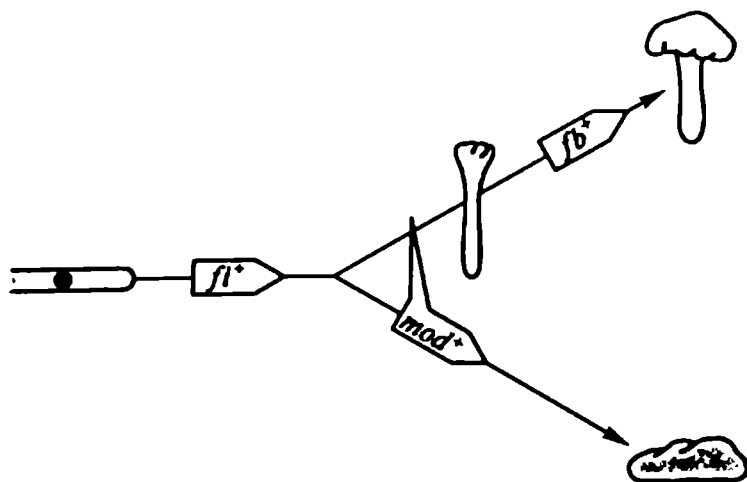


Рис. 61. Генетический контроль отдельных этапов формирования плодовых тел у *Agrocybe agerita* (F. Mainhardt, K. Esser, 1981)

ация в ножку и шляпку. У мутантов *blend* (слепые) отсутствует реакция на свет и уродливые плодовые тела формируются даже на свету. За такой фенотип ответственны два гена — *dst-1*, *dst-2*. Первый гомологичен гену *White Collar (WC-1)* — фоторецептор синего света у *N. crassa* (см. с. 160). За вытягивание ножки ответствен ген *eln3-1*, продукт которого — фермент гликозилтрансфераза. Уровень его транскрипции высок только в ножке.

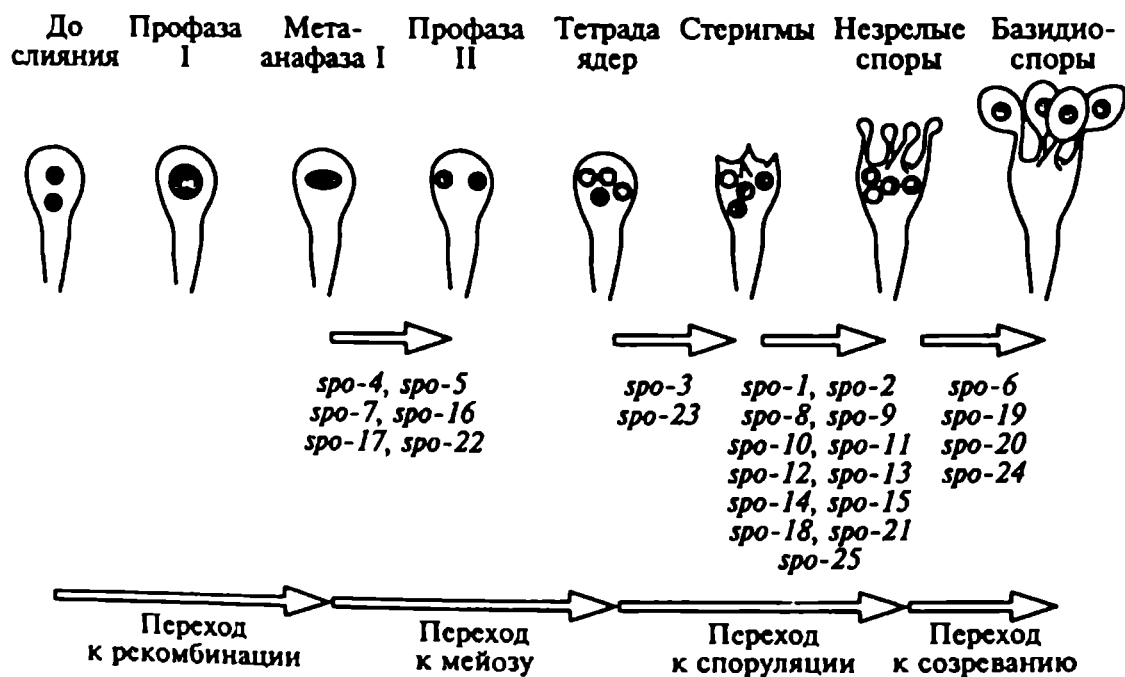


Рис. 62. Гены, влияющие на прохождения мейоза и споруляцию *Coprinus cinereus* (по D. Moor, 1998)

У *S. commune* ген, индуцирующий плодоношение гомокарионов, назван *Frt1*. Его продукт — белок из 192 аминокислот, имеющий Р-петлю, которая указывает на связь с нуклеотидами.

После того как голландский миколог Я. Вессель описал у *S. commune* белки *гидрофобины*, им стали уделять большое внимание как морфогенетическим факторам. Гидрофобины — низкомолекулярные гидрофобные белки, которые выделяются на поверхность гиф и кристаллизуются там в виде палочек. Они обуславливают гифальные взаимодействия и, следовательно, морфогенез плодовых тел. У *S. commune* в стадии мицелиального погруженного роста моно- и дикарионы образуют одинаковые гидрофобины. К началу формирования плодовых тел, в дикарионе синтезируются 6 новых гидрофобинов вследствие экспрессии генов *SC1* — *SC6*. Ген *SC3* контролирует развитие воздушных гиф и прикрепление их к гидрофобной поверхности; гидрофобины, контролируемые генами *SC1*, *SC4*, *SC6*, влияют на развитие плодовых тел. Возможно, гены *fi*⁺ и *fb*⁺ контролируют синтез определенных гидрофобинов.

Фазоспецифичные гидрофобины обнаружены и у других базидиомицетов. Например, ген *fbh1*, кодирующий синтез гидрофобина плодовых тел вешенки *Fbh1* (fruit body hydrophobin 1), содержащий 113 аминокислот, экспрессируется только в плодовых телах, но не в моно- или дикариотичном мицелии. Экспрессия гидрофобина АВН1/НурА *Agaricus bisporus* ассоциирована с быстрым ростом шляпки плодового тела.

Наконец, большое число генов (*spo*-гены) влияет на протекание мейоза и формирование базидиоспор (рис. 62).

ЧАСТЬ III

НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ГЕНЕТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ И ЭВОЛЮЦИИ ГРИБОВ

Глава 6

ЭВОЛЮЦИЯ СИСТЕМ РАЗМНОЖЕНИЯ

Система полового размножения определяет соотношение инбридинга и аутбридинга в грибных популяциях (табл. 21).

Как видно из таблицы, при отсутствии генетических систем половой совместимости (гомоталлизме) инбридинг и аутбридинг одинаково вероятны, однако вследствие возможности са-

Таблица 21. Влияние систем генетической несовместимости на способ размножения грибов
(G. Koltin et al., 1972, с дополнениями)

Система несовместимости	Локусы (виды грибов)	Число аллелей				Потенциал	
		Aa	Aβ	Ba	Bβ	инбридинга	аутбридинга
Отсутствует (гомоталлизм)	(некоторые виды <i>Pythium</i> , <i>Phytophthora</i> , <i>Sordaria</i> и др.)					100	100
Однофакторная	Aa (многие оо- и аскомицеты, некоторые Polyporaceae)	2				50	50
		4				50	75
		10				50	90
		20				50	95
	Aa Aβ (<i>Thanatephorus cucumeris</i>)	2	2			50—75*	75
		5	5			50—75	96
		10	10			50—75	99
Двухфакторная	Aa Bβ (<i>Ustilago maydis</i>)	2		2		25	25
		5		5		25	64
		10		10		25	81
		20		20		25	90
	Aa Aβ Ba Bβ (<i>Schizophyllum commune</i>)	2	2	2	2	25—56*	56
		3	2	3	2	25—56	69
		5	4	5	4	25—56	90

* Частота инбридинга может повышаться вследствие рекомбинации между сцепленными α- и β-локусами факторов спаривания.

мооплодотворения инбридинг всегда преобладает над аутбридингом.

У однофакторных грибов в потомстве от кроссов, несущих факторы A_1 и A_2 , эти факторы будут находиться в одинаковом соотношении $4A_1 : 4A_2$. Любая спора, следовательно, совместима с 50 % сиблингов, причем это не зависит от числа аллельных состояний фактора спаривания. Однако число аллельных состояний оказывает решающее влияние на потенциал аутбридинга, т. е. на вероятность совместимости двух спор, происходящих от разных родителей. При наличии двух аллелей шансы на аутбридинг и инбридинг одинаковы (50 %), но вследствие пространственного расположения спор инбридинг преобладает над аутбридингом. При возрастании числа аллелей (диафоромиксисе) потенциал аутбридинга резко увеличивается и уже при 10 аллельных состояниях достигает 90 %. Поскольку у всех исследованных базидиомицетов в природе встречается больше 10 аллелей, потенциал аутбридинга превышает 90 %.

Если фактор A состоит из двух компонентов (локусов α и β), как, например, у гетеробазидиомицета *Thanotephorus cucumeris* (анаморфа — *Rhizoctonia solani*), то потенциал инбридинга может повыситься до уровня, определяемого частотой рекомбинации между локусами. Например, если в скрещиваниях участвуют факторы A_1 (состоящий из α_1 и β_1 аллелей) и A_2 (также состоящей из α_2 и β_2), то рекомбинантные споры будут иметь факторы A_3 ($\alpha_1 \beta_2$) и A_4 ($\alpha_2 \beta_1$), которые совместимы как с A_1 -, так и с A_2 -сиблингами. Если локусы α и β не сцеплены, то потенциал инбридинга возрастет до 75 %; в зависимости от степени сцепления он будет колебаться от 50 до 75 %. Зависимость частоты инбридинга от частоты рекомбинации можно рассчитать по уравнению

$$50 \% + P_A - (P_A^2/100),$$

где P_A — частота рекомбинации между локусами. Однако небольшое увеличение вероятности инбридинга компенсируется ростом вероятности аутбридинга.

У бифакториальных грибов кроссы между $A_1 B_1$ и $A_2 B_2$ дадут 4 состояния факторов спаривания у потомков (два родительских и два рекомбинантных), причем каждый тип потомка совместим только с одним из четырех (правило Книппа, см. с. 182). Таким образом, бифакториальная система эффективно снижает потенциал инбридинга. Однако она снижает и потенциал аутбридинга. В частности у видов, имеющих только по два аллеля каждого фактора, потенциал аутбридинга, как и инбридинга, составляет 25 %. Если каждый фактор имеет по 5 аллелей, то вероятность аутбридинга возрастет лишь до 64 % (при однофакториальной системе 90 %). Чтобы достигнуть 90 %, необходимо распределение между

двумя факторами 40 аллелей. Следовательно двухфакторная система менее эффективно, чем однофакторная, обеспечивает аутбридинг, но лучше ограничивает инбридинг.

Наибольший компромисс между ограничением инбридинга и обеспечением аутбридинга достигается при двухлокусной бифакториальной системе. Возможно поэтому она широко распространена среди холобазидиомицетов. Если факторы двухлокусны, то потенциал инбридинга вследствие рекомбинации повысится с 25 до максимум 56 %. При сцеплении потенциал инбридинга ниже. Так, у *Schizophyllum commune* средняя частота рекомбинации по фактору *A* составляет 9,5 %, а по фактору *B* — 2,3 %. Это дает потенциал инбридинга 30,6 %. У *S. commune* обнаружен генетический контроль рекомбинации внутри факторов спаривания. Он включает много генов, каждый из которых влияет на частоту рекомбинации в небольшой специфической области генома, причем гены, снижающие частоту рекомбинации, доминируют в дикарионе над своими аллелями, обеспечивая селективное преимущество низкой частоты рекомбинации над высокой. Вместе с тем при бифакториальной системе с двухлокусным строением факторов небольшое число аллелей дает большое число их сочетаний, что резко повышает потенциал аутбридинга. Например, при однолокусной бифакториальной системе для достижения потенциала аутбридинга, равного 90 %, необходимо 40 аллелей, а при двухлокусной — только 18. Таким образом, двухлокусная система обеспечивает наилучшие условия для перекрестного размножения и создания панмиксных популяций.

Таким образом, гомоталлизм дает 100 %-ю вероятность инбридинга и способствует переходу генома в гомозиготное состояние, а у гаплоидных видов гомоталлизм способствует виртуальной гомозиготности — снижению внутрипопуляционного полиморфизма. Гетероталлизм, напротив, способствует потоку генов между особями и интеграции популяций и вида в целом в единую систему. Сложные системы генетического контроля несовместимости (диафоромиксис, тетраполярность, двухлокусное строение факторов спаривания с возможностью рекомбинации между локусами) способствуют панмиксии. Поэтому в условиях, где необходима стабилизация адаптивных комплексов генов (стабильные внешние условия, стабилизирующий отбор), может происходить отбор на снижение рекомбинации, а в нестабильных условиях жизни, где необходима высокая вариация (адаптивность), может идти отбор на ее увеличение. Изложенные выше сведения о механизмах регуляции полового процесса показывают, что у грибов имеются широкие возможности для развития в том или ином направлении.

1. Усиление роли рекомбинации, образование панмиксных популяций, интеграция клонов, популяций и вида в единую си-

Увеличение рекомбинации

Биполярный гетероталлизм. Поскольку мы не знаем, что было первичным — гомо- или гетероталлизм, наиболее вероятно допустить возможность многократных переходов между ними.

В 50-х гг. XX в. Л. Олив высказал гипотезу о возникновении локуса спаривания через систему нестабильного морфологического гетероталлизма (см. с. 168). Например, у сумчатого гриба *Glomerella cingulata* Х. Вилер описал большое число природных мутантов, у которых нарушено прохождение отдельных этапов полового цикла — от формирования перитециальных инициалей до прорастания аскоспор (рис. 63). Каждый мутант самостерилен, но может скрещиваться с неаллельным мутантом вследствие комплементарной компенсации повреждений на стадии дикариона, т.е. имеет место гетероталлизм по определению Блэксли. Однако в потомстве таких гибридов могут возникать как гетероталлические штаммы (родительных типов), так и рекомбинантные. Последние могут иметь аллели дикого типа обоих поврежденных генов и быть гомоталлическими самофертильными, или иметь оба мутантных гена и не скрещиваться с обоими родителями. Вследствие неравного кроссинговера могло произойти совмещение поврежденных генов в одном или двух тесно сцепленных локусах. Такие конструк-

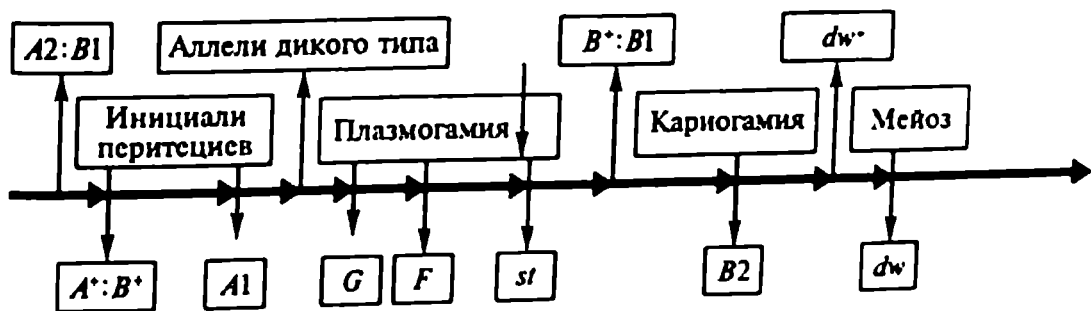


Рис. 63. Этапы полового цикла у аскомицета *Glomerella cingulata* и мутации, прерывающие половой цикл (по Н. Е. Wheeler, 1946, с изменениями)

ции в дальнейшем были поддержаны отбором в условиях, не способствующих инбридингу, вследствие чего мог возникнуть биполярный диаллельный гетероталлизм.

В пользу данной гипотезы свидетельствует молекулярный анализ локусов спаривания.

1. Как было показано, «аллели» локуса спаривания не гомологичны по длине и нуклеотидным последовательностям. Возможно, они ранее были расположены в разных частях генома и объединены вследствие эктопической рекомбинации.

2. У некоторых сумчатых и базидиальных грибов обнаружены гомологичные локусу спаривания последовательности (кассеты) в отдаленных от него местах генома.

3. Фактор спаривания содержит несколько транскриптов, представляющих собой группу сцепленных генов, различающихся функциями.

4. Гены, составляющие фактор спаривания (за исключением генов, входящих в состав функционально независимых локусов α и β базидиомицетов), не рекомбинируют и расходятся в мейозе как один локус (представляют собой так называемые “холодные точки рекомбинации”). Например, гены *mat2* и *mat3* делящихся дрожжей *Schizosaccharomyces pombe*, находящиеся друг от друга на расстоянии 1 тыс. н.п., рекомбинируют с частотой в 1000 раз меньшей ожидаемой при таком физическом расстоянии. Репрессия рекомбинации связана со структурой хроматина в *mat*-области.

Указанный выше механизм возникновения гетероталлизма подтвержден экспериментально (Lee et al., 2003). У гомоталлического гриба *Gibberella zeae* две идиоморфы — *MAT1-1* и *MAT1-2* — находятся в одном геноме и сцеплены. Получены мутанты *MAT1-1/MAT1-0* и *MAT1-0/MAT1-2*. Они оказались самостерильными, но скрещивались друг с другом.

Тетраполярный гетероталлизм. Если считать, что биполярный гетероталлизм возник вследствие объединения группы генов, функционально связанных с половым циклом, то образование тетраполярного гетероталлизма может возникать, наоборот, вследствие пространственного разделения отдельных генов комплекса спаривания. Например, у тетраполярного головневого гриба *Ustilago maydis* факторы *a* и *b* содержат гены, несущие разные функции (см. с. 190—192), а у биполярного *U. hordei* эти группы генов объединены в один большой кластер с нетранслирующейся областью между ними, имеющей протяженность 500 тыс. н.п. в идиоморфе *MAT-1* и 430 тыс. н.п. в *MAT-2*. Рекомбинации между ними крайне редки (порядка 10^{-5}).

Морфологическая эволюция половых структур. Важную роль играют такие факторы, как увеличение размеров плодового тела, его продуктивности, способы защиты формирующихся мейоспор и способы их распространения.

Огромная продуктивность мейоспор, их раслет на далекие от места формирования расстояния, сложная система несовместимости приводят к аутбридингу и формированию панмиксных популяций. В этих условиях клональное размножение может только препятствовать панмиксису, поэтому у многих сумчатых и базидиальных грибов — макромицетов — анаморфы не играют большой роли или вообще отсутствуют.

Снижение рекомбинации

Инбридинг. Инбридинг у грибов может достигаться разными путями, обеспечивающими переход гетероталлизма в гомоталлизм.

Истинный гомоталлизм. Среди аскомицетов гомоталлизм встречается очень часто. Его генетический контроль можно проиллюстрировать на примере рода *Neurospora*, в котором есть гомо- и гетероталлические виды. После того как были клонированы факторы спаривания *N. crassa*, их использовали в качестве проб для анализа наличия соответствующих последовательностей ДНК у разных видов *Neurospora* и родственных родов (табл. 22).

Из таблицы видно, что только у одного гомоталлического вида, *N. terricola*, в геноме имеются оба фактора спаривания, т.е. обеспечено объединение функций двух родителей, остальные виды этого рода имеют только фактор А, который, следовательно, обеспечивает весь половой морфогенез. Почему он не может быть обеспечен штаммами гетероталлических видов, имеющих фактор *mata*, неизвестно. Возможно, для этого необходимы еще какие-то последовательности ДНК, отсутствующие у гетероталлических видов. Например, у гомоталлического вида *Podospora setosa* наряду с сцепленным кластером генов FPR1, FMR1, SMR1 и SMR2 (факторы

Таблица 22. Регуляция полового процесса у видов семейства Sordariaceae (V. Glass et al., 1990)

Виды	Идиоморфы	Виды	Идиоморфы
Гетероталлические: <i>Neurospora crassa</i> <i>N. sitophyla</i> <i>N. intermedia</i>	A или a	Гомоталлические: <i>N. terricola</i> <i>N. africana</i> <i>N. dodgei</i> <i>N. galapogensis</i> <i>Gelasinospora spp.</i> <i>Sordaria spp.</i>	Aa A A A Aa
Псевдогомоталлические: <i>N. tetrasperma</i> <i>Podospora anserina</i>	A + a		

А и а). обнаружены 3 несцепленные копии, гибридизирующиеся с FRP1.

Переход от гетеро- к гомоталлизму может быть обеспечен селективной гибелью одного типа гамет. Так, в популяциях головневового гриба *Ustilago violaceae*, поражающего *Silene alba*, большинство телиоспор формировали споридии только одного типа спаривания — *a1*. Половой процесс у них осуществлялся конъюгацией соседних клеток промицелия (фрагмобазидии) через миецелиальные мостики. Формирующиеся гомокариотические дикарионы могли заражать завязи смолевки. По-видимому, фактор спаривания *a2* сцеплен с рецессивной леталью и элиминируется, а отбор таких конструкций обусловлен более высокой инфекционностью и патогенностью гомоаллельных по локусу спаривания дикарионов.

Псевдогомоталлизм. В его основе лежит образование не одного, а двухъядерных мейоспор, причем вследствие неслучайной ориентации веретена в одну спору попадают ядра, гетероаллельные по типу спаривания, т.е. уже в споре образуется гетерокариотический дикарион. У аскомицетов описаны два механизма, обеспечивающие попадание в аскоспоры ядер с противоположными аллелями локуса спаривания. У *Neurospora tetrasperma mat* локус, находящийся на хромосоме I, сцеплен с центромерой и сегрегировывает, как и у *N. crassa*, в первом мейотическом делении. В двух последующих делениях у *N. tetrasperma* веретена деления располагаются параллельно друг другу, тогда как у *N. crassa* они расположены тандемно (см. рис. 47). Поэтому несестренские ядра у *N. tetrasperma* располагаются близко друг от друга в каждой половине аска и соответственно обособляются в 4 аскоспоры. В родах *Podospora* и *Gelasinospora* у псевдогомоталлических видов факторы спаривания сегрегируют во втором делении, два веретена располагаются тандемно, и ядра с противоположным типом спаривания ассоциируются в пары в каждой половине аска. В третьем делении у всех видов веретена разделяются на две отдаленные друг от друга пары, причем у *Gelasinospora* пары веретен ориентированы параллельно стенке аска, а у *Neurospora* и *Podospora* — поперек аска (рис. 64).

Псевдогомоталлизм приводит к высокой степени инбредности и, следовательно, к внутригеномной рекомбинации. А это, в свою очередь, должно вызвать возникновение гомозигот по факторам спаривания, т.е. к потере гомоталлизма. С использованием полиморфизмов ДНК в качестве генетических маркеров была подтверждена высокая степень гомозиготности по всем хромосомам *N. tetrasperma*, кроме хромосомы, на которой расположен локус спаривания, — генетические маркеры этой хромосомы были в основном гетерозиготны. Следовательно, у *N. tetrasperma* имеется генетический запрет на рекомбинацию генов, сцепленных с *mat*-

локусом. Отсутствие рекомбинации в этой области продемонстрировано тетрадным анализом гибридов (в потомстве наблюдали только родительский дитип) и цитологически (на стадии пахитены у *N. tetrasperma* наблюдали большой неспаренный сегмент в центре самой длинной хромосомы, концы которой нормально спарены). Общая длина нерекombинирующегося сегмента равна примерно 120 единиц карты, что составляет 50—60 % от всей длины хромосомы 1 (200 единиц карты) и 10 % от всего генома, составляющего примерно 1000 единиц карты. Таким образом, хромосома 1 ведет себя как половая хромосома животных.

Так же подавлена внутрихромосомная рекомбинация и у псевдогоматаллического базидиомицета — культивируемого шампиньона *Agaricus bisporus* (табл. 23).

Описанные аско- и базидиомицеты амфиталличны, ибо у них наряду с двухъядерными гомоталличными мейоспорами в сумках и на базидиях в небольшом проценте формируются одноядерные гетероталлические. В первом случае спора при прорастании сразу формирует гетерокариотический мицелий с плодовыми телами на нем, во втором случае необходимо слияние потомства одноядерных спор. Исследования, проведенные в процессе селекционной работы с шампиньоном, показали, что гомоталлические

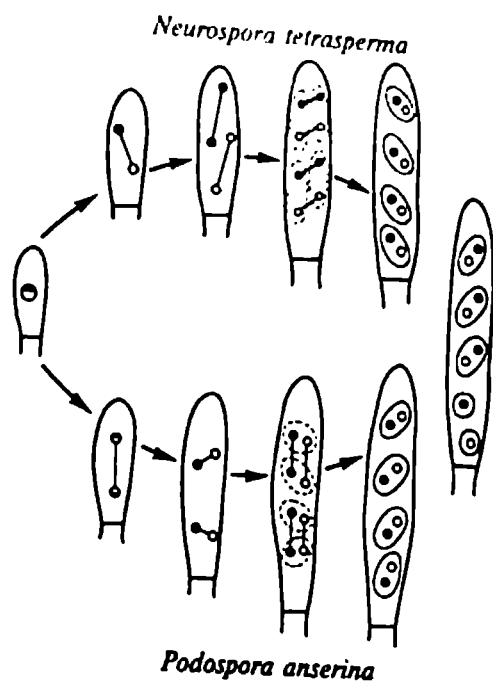


Рис. 64. Ориентация веретен деления ядер у двух псевдогоматаллических аскомицетов — *Neurospora tetrasperma* и *Podospira anserina*. Объяснения см. в тексте

Таблица 23. Соотношение гомо- и гетерозигот у мейотического (базидиоспорового) потомства *A. bisporus* (R. Rouse, B. May, 1982; R. Summerbell et al., 1989)

Изоферментные маркеры	RFLP- маркеры ДНК
GTP — 3/149	PAG33n10 — 0/279
MPI — 0/78	PAG4n6 — 1/79
PER-1 — 6/149	PAG4n27 — 1/357
ADH — 5/76	PAG33n25 — 2/106

споры формируют на агаровых средах медленно растущие колонии, не способные оккупировать естественные субстраты, имеют пониженную жизнеспособность и не могут длительно существовать в природе, т.е. отбор у этого вида направлен на поддержание псевдогомotalлизма.

Интересные переходы в ядерном статусе описаны у комплекса *Armillaria* (осенний опенок). Большинство видов этого комплекса утратили стадию дикариона и после слияния гиф первичного мицелия формируют не двухъядерные клетки с пряжками, а клетки с одним диплоидным ядром без пряжек, т.е. вслед за плазмогамией протекает кариогамия, а стадия дикариона утрачена. У некоторых видов (*A. gallica*) кариогамия и мейоз протекают в жизненном цикле дважды: в гифах субгимения диплоидные ядра, как бы «вспомнив», что в базидии должна быть кариогамия, делятся мейотически, образуя двухъядерные клетки с пряжками. В базидии, как это бывает обычно, ядра сливаются и делятся мейотически с образованием четырехгаплоидных одноядерных спор. У европейских штаммов *A. mellea* этот атавизм отсутствует, и диплоидное ядро переходит в базидию, где делится мейотически с образованием четырех гаплоидных спор. У обнаруженных в Японии штаммов *A. mellea* гаплоидные ядра базидии после мейоза попарно сливаются и в базидиоспоры переходят одно или два диплоидных ядра. Таким образом, японские штаммы опенка вторично гомotalличны и строго инбредны.

Кассетный механизм переключения типов спаривания — еще один способ снижения рекомбинации. Он описан у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, а также у базидиомицетов *Agrocybe aegerita* и *Agaricus campestris*. Он обеспечивает половой процесс внутри односпорового потомства, т.е. гомotalлизм.

Агамность. Агамные грибы лишены полового процесса. Их возникновение может быть результатом популяционных или генетических процессов.

Популяционные процессы приводят к потере и пространственному разделению штаммов гетерotalлических видов, имеющих разные аллели локуса спаривания. Популяции теперь представлены только одним типом спаривания, а размножение — вегетативным, т.е. клональным. В основе пространственного разделения локусов спаривания могут быть как случайные процессы (дрейф генов), так и отбор.

Примером *дрейфа* может быть панглобальное распространение штаммов *Phytophthora infestans*, имеющих тип спаривания A1. Молекулярные исследования популяций возбудителя фитофтороза картофеля, распространенных в разных странах, показали, что длительное время всюду встречался только один клон, случайно попавший в США и Европу в середине XIX столетия из Мекси-

ки. Жизненный цикл этого оомицета включал несколько генераций бесполого размножения летом на листьях и зимовку мицелия в клубнях зимой. И только в конце XX в. в Европе в связи с интенсивным экспортом картофеля появились оба типа спаривания и стали находить половые споры (ооспоры).

Примером отбора может быть соотношение типов спаривания *A* и *B* в популяциях возбудителя голландской болезни язвов аскомицета *Ophiostoma ulmi*. Нсагрессивные штаммы этого гриба имеют соотношение, близкое к 1 : 1. У агрессивных штаммов свыше 85 % изолятов имеют тип *B*, который более патогенен. Преимущественно вегетативное размножение агрессивных штаммов, обусловленное асимметричным распределением типов спаривания, позволяет защитить от разрушения вследствие рекомбинаций адаптивные комплексы генов.

Генетические процессы могут привести к изменениям, блокирующим протекание полового процесса. Об этом свидетельствуют опыты по гибридизации ДНК близкородственных видов анаморфного рода *Bipolaris*. Возбудитель южного гельминтоспориоза кукурузы *B. maydis* имеет сумчатую стадию *Cochliobolus heterostrophus*. Идиоморфы локуса спаривания этого гриба были клонированы и использованы в качестве пробы в блот-гибридизациях с ДНК морфологически близкого, но не имеющего сумчатой стадии (несовершенного) гриба *B. sacchari*, возбудителя пятнистости листьев сахарного тростника. Оказалось, что штаммы, выделенные из одной популяции, имеют *mat-1* или *mat-2*, т.е. в одной популяции встречаются носители обоих типов спаривания. Однако гетероаллельные штаммы при совместном росте на питательных средах или на растении не формировали псевдотециев. Локус *mat-2* переносили из штамма *B. maydis* в штамм *C. heterostrophus*, у которого свой локус был deletирован. Штамм с такой конструкцией скрещивался с штаммами того же вида, имеющими противоположный тип спаривания, и формировал псевдотецции. Следовательно, асексуальность *B. sacchari* обусловлена дефектами не в локусе спаривания, а генах, контролирующих последующие этапы полового цикла. Возникновение таких дефектов, возможно, проходило следующие этапы (J. F. Leslie, K. K. Klein, 1996).

Большинство аскомицетов — гермафродиты, причем мужскими гаметами у них часто служат конидии. Благодаря двойственной роли мужских гамет (оплодотворение трихогины и бесполое размножение) мутанты, потерявшие их, нежизнеспособны. Однако мутации, вызывающие дефекты в синтезе женских половых структур, не снижают жизнеспособности в стадии анаморфы, и даже энергетически выгодны (питание не тратится на формирование ненужных структур). Поскольку у женских штаммов протекает сложный морфогенез, контролируемый большим числом ге-

Таблица 24. Наследование скорости мицелиального роста у гибридов (C. Caten, J. Jinks, 1976)

Кроссы	Среднее в генерациях			Компоненты	
	P1	P2	F	[m]	[i]
<i>Schizophyllum commune</i>					
L1 × H1	97,00	56,00	77,23	76,50	-0,73 ± 1,56
L1 × H2	104,50	54,75	81,12	79,62	-1,49 ± 1,55
L2 × H1	101,00	53,50	75,78	77,25	+1,47 ± 2,50
L2 × H2	106,50	44,50	77,32	75,50	+1,85 ± 2,76
<i>Emericella nidulans</i>					
9 × 43	6,70	5,80	5,28	6,25	+0,97 ± 0,17
37 × 114	4,80	4,20	4,04	4,50	+0,46 ± 0,16

Примечание. P1 и P2 — родительские штаммы; F — гибриды; [m] — аддитивная вариация (среднее между родителями); [i] — эпистаз.

нов, подобные мутации возникают часто, в связи с чем природные штаммы многих аскомицетов состоят из смеси мужских и гермафродитных штаммов. Вследствие дрейфа или отбора возможно появление популяций, которые полностью потеряли способность к формированию перитециев.

У анаморфных грибов потеря полового процесса, как у псевдогомоталлических, — потеря гетероталлизма, поддерживается отбором. Это наглядно видно из опытов по гибридизации панмиксного базидиомицета *Schizophyllum commune* и аскомицета *Emericella nidulans* (анаморфа *Aspergillus nidulans*), эволюционирующего по пути утраты полового процесса (табл. 24).

Из приведенных данных видно, что гибридное потомство штаммов *S. commune* имеет средние показатели между родителями (основной вклад в вариацию вносит аддитивность), а у *Emericella (Aspergillus) nidulans* скорость роста потомства ниже, чем даже у медленно растущего родителя (достоверно наличие эпистаза), т. е. отбор направлен против гибридов.

Экологическая роль систем размножения

По-видимому, преобладание той или иной стратегии размножения связано с условиями жизни популяции. В гетерогенных условиях, где решающее условие для сохранения популяции имеет не специализация, а широкий размах изменчивости, преимущества имеют половые популяции, в которых создается разнообразие генотипов. В гомогенных условиях отбор оперирует в направ-

лении высокой приспособленности именно к этим условиям, т.е. к специализации, снижению вариабельности и рекомбинации, способной разрушить адаптивные комплексы генов. Так, в агроценозах фитопатогенные грибы встречаются с резко изменившимися по сравнению с природными фитоценозами условиями жизни. Во-первых, скопление большого числа одинаковых по восприимчивости растений-хозяев приводит к значительному увеличению емкости среды и повышению в связи с этим роли г-отбора. Генетическая рекомбинация семейств клонов часто становится эволюционно невыгодной. Периодический отбор, связанный с флуктуацией внешних условий (например, с выращиванием устойчивого сорта), могут обеспечивать мутации, всегда присутствующие в огромных по численности популяциях. Во-вторых, культивируемые растения по сравнению с дикорастущими находятся в более стабильных условиях, причем у многих изменился жизненный цикл. Например, осенний посев озимых злаков дает возможность всю зиму сохраняться под снегом зеленым частям растений, на которых сохраняются их паразиты. Хранение посадочных клубней, корнеплодов, луковиц создает новые комфортные условия для зимовки ряда паразитов.

Все это изменило роль половой генерации в жизненном цикле ряда грибов: у некоторых (возбудитель мучнистой росы злаков *Erysiphe graminis*) она сместилась с зимнего на летний период, у других вообще выпала из жизненного цикла (многие ржавчинные грибы, мучнистая роса винограда, фитофтора картофеля, а в некоторых зонах — мучнистая роса и парша яблони, мильдью винограда). Зимовка этих грибов осуществляется в мицелиальной фазе на озимых растениях, хранящихся вегетативных органах или в почках древесно-кустарниковых пород.

По-видимому, изменения условий жизни, связанные с сельскохозяйственной деятельностью, наложили отпечаток на систему размножения не только фитопатогенных, но и сапротрофных грибов. Так, культивируемый шампиньон *Agaricus bisporus* является псевдогомоталличным видом, тогда как дикорастущие виды рода гетероталличны. Вне культивационных помещений *A. bisporus* обычно находят на частично перепревшем навозе животноводческих ферм, причем анализ молекулярных маркеров показывает, что часть штаммов ушла из культуры. Однако под кипарисами в калифорнийской пустыне Сонора был обнаружен большой запас пропагул *A. bisporus* с четырьмя одноядерными спорами на базидиях. Аналогичные изоляты выделены в лесных биоценозах (но не фермах) во Франции. Четырехспоровые штаммы свободно скрещиваются с двухспоровыми, т.е. принадлежат к одному виду. Можно полагать, что исходные штаммы этого гриба были четырехспоровыми, но в стабильных условиях роста на богатом субстрате произошли отбор псевдогомоталличных штаммов и по-

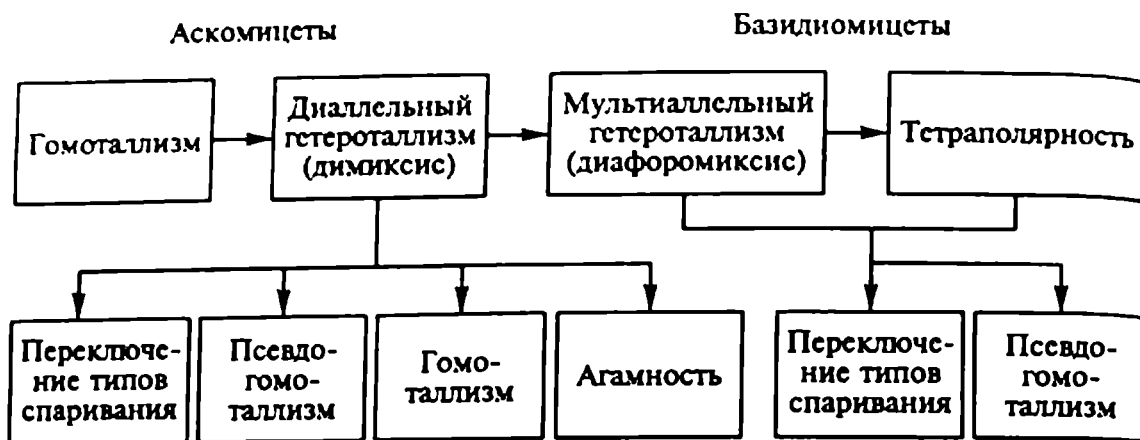


Рис. 65. Эволюция систем размножения в разных группах грибов.

Горизонтальные стрелки указывают на направление эволюции в сторону увеличения рекомбинации, вертикальные стрелки — в сторону уменьшения рекомбинации

давление рекомбинации (кстати, маркеры, не рекомбинирующие у двухспоровых штаммов, нормально рекомбинируют у четырехспоровых). Хотя четырехспоровость у гибридов доминирует над двухспоровостью, гомокариотические изоляты, случайно возникающие из одноядерных спор двухспоровых штаммов, нежизнеспособны и элиминируются.

В разных группах грибов снижение роли рекомбинации достигается различными путями (рис. 65). Возможно, это обусловлено следующими причинами.

■ **Адаптивная роль половых и вегетативных структур.** Гомоталлические и псевдогомоталлические виды *Neurospora* распространены на границах ареала, где плотность популяций, а, следовательно, и вероятность встречи партнера с противоположным типом спаривания низкая. Обычные места обитания этих грибов — обгоревшие после пожара травянистые фитоценозы. Наиболее устойчивы к высокой температуре аскоспоры, поэтому эволюция привела не к агамности, а к гомоталлизму. Также редки агамные виды у мукоровых, где половые структуры (зигоспоры) служат для перенесения неблагоприятных условий жизни. У аскомицетов, которые переносят неблагоприятные условия в виде мицелиальных структур, таких, как склероции (например, *Botryotinia*), утрата полового процесса наблюдается гораздо чаще.

■ **Особенность эволюции отдельных таксонов.** Эволюция в сторону потери рекомбинации у димиктичных сумчатых грибов гораздо чаще заканчивается агамностью (большинство несовершенных грибов генетически связаны с аскомицетами), нежели у диафоромиктичных базидиальных. Для последних редки не только потеря полового процесса, но даже истинный гомоталлизм. Можно полагать, что в этой группе грибов эволюция полового процесса зашла настолько далеко, что анаморфы вообще потеряли функ-

цию размножения. Как было показано выше, потеря одного типа спаривания у головневового гриба привела не к потере полового процесса, как у оо- или аскомицетов, а к гомоталлизму, ибо дикариотизация головневых грибов необходима для мицелиального роста и патогенности.

■ *Доминирующая жизненная стратегия.* Как показал С. Брейзер, потеря половых структур характерна для более рудеральных *r*-стратегов, чем для стресс-толерантных *K*-стратегов. Большинство несовершенных грибов произошло от сумчатых, которые представляют собой в массе гаплоидных *r*-стратегов. Дикариотичные базидиомицеты имеют большую забуференность генетических систем и тенденции к *K*-стратегии, поэтому они чаще не теряют половые структуры, а переходят к псевдогомоталлизму.

ГЕТЕРОКАРИОЗ И ВЕГЕТАТИВНАЯ НЕСОВМЕСТИМОСТЬ

ГЕТЕРОКАРИОЗ

Как было описано ранее (см. гл. 1), мицелиальные грибы имеют общее свойство: при физическом контакте происходит слияние их клеток (анастомозы гиф). Поскольку грибные гифы покрыты многослойными оболочками, слиянию предшествует локальное растворение клеточных стенок. Возможно, это свойство первоначально возникло вследствие необходимости слияния лишённых гамет вегетативных структур у грибов. Предполагается также, что в основе анастомозов был микопаразитизм, при котором описаны как гаусториальный, так и негаусториальный типы слияния.

Анастомозы гиф играют важную роль в адаптациях грибов к условиям жизни. Если слившиеся клетки содержат генетически различные ядра, то при анастомозах они попадают в общую цитоплазму (явление гетерокариоза). Митозы обеспечивают пролиферацию разных аллельных состояний отдельных генов в гетерокарионе. У грибов с гаплоидными ядрами гетерокариоз заменяет диплоидность, ибо в гетерокариотической клетке фенотипически выражаются те же аллельные отношения (доминантные, рецессивные, кодоминантные), что и в гетерозиготной. Однако между гетерокариозом и гетерозиготностью есть ряд отличий.

■ В гетерокариозе аллельные гены и их транскрипты пространственно разделены, ибо находятся в разных компартментах, разделённых ядерными оболочками (ядерно-лимитированный контроль). Поэтому рецессивные мутации, комплементирующиеся в диплоидах, не всегда комплементарны в гетерокарионах, хотя бы вследствие того, что взаимодействующие генопродукты не достигают в цитоплазме необходимой критической концентрации вследствие диффузии из разных мест. Известны и более сложные ситуации. Например, ген-модификатор (*mod*) не модифицирует устойчивость или чувствительность *Coprinus cinereus* к *p*-фторфенилаланину, обусловленные аллелями *pfp^R* и *pfp^S*, в гомокарионе и гетерозиготном диплоиде, но модифицирует ее в гетерокарионе. Возможно, модификатор влияет на цитоплазматический комплекс генопродуктов в цитоплазме, но не в ядре.

■ У большинства грибов число ядер в клетках не фиксировано, поэтому соотношение аллелей может отклоняться от 1 : 1. Это может приводить к широкой вариации фенотипов, обуслов-

ленной соотношением ядер. Например, для изучения влияния соотношения ядер в гетерокарионе на фенотип, у *Phycomyces blakesleeanus* получали гетерокарионы с фиксированным числом ядер между бесцветными, чувствительными к антибиотику ($w\ dar^S$), и краснопигментными, устойчивыми к антибиотику ($red\ dar^R$), штаммами (табл. 25). Как видно из таблицы, мутация по устойчивости полностью доминантна и почти не зависит от соотношения гетероаллельных ядер, в то время как пигментная мутация дает широкую вариацию в окраске в зависимости от соотношения ядер.

Если изменение условий жизни сопровождается изменением соотношения ядер, контролирующих адаптивные признаки, то этот процесс может обеспечить быструю адаптацию гриба к изменяющимся условиям без изменения ядерных геномов (мутаций, рекомбинаций и т. п.). Поэтому гетерокариоз рассматривался как «гибкий механизм физиологической адаптации, суть которого заключается в количественных изменениях качественно фиксированного множественного генома» (Р. Станисер, 1956).

■ У дрожжей-сахаромицетов было обнаружено явление скрытого гетерокариоза, при котором гетерокариотические клетки показывают фенотип, обусловленный генами только одного ядра, а второе ядро, даже имеющее доминантные по отношению к первому гены, находится в скрытом состоянии (О. В. Невзглядова с соавт., 2000). Полагают, что это вызвано низкой частотой деления ядра, которое переходит лишь в небольшое число клеток почкующейся популяции. Однако при определенных условиях (состав питательной среды и др.) возможны накопление и фенотипическая визуализация скрытых ядер в популяциях. Авторы полагают, что «обнаруженное явление скрытого гетерокариоза встречается и у других эукариот и представляет некое фундаментальное свой-

Таблица 25. Тест на доминантность у гетерокарионов *P. blakesleeanus* (M. Delbruck, T. Ootaki, 1979)

% ядер $red\ dar^R$	Цвет колонии	Устойчивость
0	Белый	Чувствителен
10	Бело-желтый	Чувствителен
25	Палево-желтый	Чувствителен
47	Желтый	Чувствителен
75	Темно-желтый	Чувствителен
85	Оранжевый	Получувствителен
91	Красный	Получувствителен
100	Красный	Устойчив

ство живого, позволяющее ему адаптироваться в критических условиях, в которых действие ранее молчащего ядра может оказаться решающим».

У многих грибов гетерокариоз сопровождается редкими слияниями ядер в вегетативных клетках и образованием гетерозиготных диплоидных ядер. После попадания такого диплоидного ядра в спору возникает диплоидный клон, в ядрах которого может протекать генетическая рекомбинация вследствие парасексуального процесса (см. выше). Наконец, анастомозы между гифами с последующей миграцией ядер приводят к исчезновению внутривидовых популяционных единиц — индивидуумов, клонов — и интеграции их в единую сеть мицелия, что также усиливает адаптационные возможности. Например, росток одной споры фитопатогенных грибов из родов *Botrytis* и *Fusarium* не может пробиться через растительные покровы: для формирования апрессория и внедрения необходимы анастомозы на поверхности листа и амплификация ядер.

Описанные представления о роли гифальных взаимодействий сложились на основании исследований, проводимых с генетически маркированными лабораторными штаммами грибов. Как только началось изучение большого числа выделенных из природы штаммов, оказалось, что большинство изолятов при попарном посеве не формирует гетерокарионы вследствие вегетативной несовместимости. Поскольку вегетативная несовместимость препятствует формированию гетерокарионы со всеми описанными выше их адаптационными преимуществами, наличие сильного естественного отбора в пользу несовместимости заставило обратить внимание как на сам феномен несовместимости, так и на его эволюционные последствия.

Вегетативная несовместимость

Генетика вегетативной несовместимости

Вегетативная несовместимость проявляется при наличии у двух штаммов разных генов, ответственных за совместимость. Таким образом, она диаметрально противоположна половой совместимости, для проявления которой необходима гетероаллельность по генам совместимости. Поэтому вегетативную несовместимость немецкий генетик К. Эссер назвал гетерогенной, а половую — гомогенной. Она обнаружена во всех группах грибов.

A/a-идиоморфы. Исследования генетики вегетативной несовместимости впервые были проведены с грибом *Neurospora crassa*, у которого давно было обнаружено, что штаммы, относящиеся к разным типам спаривания, не формируют при совместном выра-

щивании гетерокарионов. Более того, в зоне контакта между колониями таких штаммов обнаруживается полоса из вакуолизированных мертвых клеток (барраж), а клетки, примыкающие к зоне контакта, окрашиваются в интенсивный оранжевый цвет. Поскольку не выделено ни одной рекомбинантной культуры в гибридах, у которых локус спаривания маркирован тесно сцепленными фланкирующими локусами, был сделан вывод о том, что вегетативная несовместимость вызвана гетероаллельностью по *mat*-локусу. Получены мутанты A^m и a^m , формирующие гетерокарионы между гетероаллельными по типам спаривания штаммами, которые были стерильны. Они формировали протоперитеции с трихогией (следовательно, *mat*-гены не контролируют образование префертилизационных женских структур), однако не секретируют феромоны. Как показано ранее (см. с. 176), фактор *mtA* содержит три гена, а фактор *mta* — один. Последовательности, требующиеся для вегетативной несовместимости и фертильности, находятся в рамках считывания *mta-1* и *mtA-1*. Оба гена кодируют регуляторы транскрипции, содержащие связывающийся с ДНК домен. Делеционным анализом удалось эти функции (несовместимость и фертилизация) разделить. Продукты мутантных генов не утратили способности связываться с ДНК. Следовательно, белки MAT-A и Mat-a полифункциональны и благодаря наличию области, богатой повторами лейцина (LRR — leucine rich repeat) и алифатической альфа-спирали взаимодействуют друг с другом и с другими белками. Один из них — белок Tol (tolerance), протяженностью 1011 аминокислот. Взаимодействие с ним обеспечивает гетерокарионную несовместимость. Локус *tol*⁺ картирован на хромосоме IV (не сцеплен с локусом спаривания). Рecessивные спонтанные и индуцированные мутации, подавляющие несовместимость, картируются в этом локусе. У псевдогомоталличного вида *N. tetrasperma* запрет на гетероаллельность по фактору спаривания отсутствует, ибо аскоспоры исходно содержат гетероаллельные по спариванию ядра (см. с. 202). Аллели локуса *TOL* — *tol*^C (у *N. crassa*) и *tol*^T (у *N. tetrasperma*) были реципрокно интродуцированы в противоположные геномы. Аллель *tol*^T в *N. crassa* вел себя как recessивный супрессор гетерокарионной несовместимости, а *tol*^C в *N. tetrasperma* — как доминантный супрессор гетерокарионной совместимости. Таким образом, совместимость *N. tetrasperma* обусловлена неактивной формой Tol-белка.

het-Гены. У *N. crassa* описано 10 локусов, гетероаллельность по которым вызывает образование барража и гибель слившихся клеток. Большинство локусов диаллельны, но в локусе *het-C* обнаружено три аллеля (OR, PA и GR), а в локусе *het-B* — четыре. Молекулярное исследование локуса *het-6* показало наличие двух генов, которые наследуются как единый блок — *het-6* и *un-24*. Первый имеет области гомологии с геном *tol* и геном вегетативной

несовместимости *Podospora anserina* *het-e*. Второй кодирует большую субъединицу фермента рибонуклеотидредуктазы, необходимой для синтеза ДНК.

Поскольку природные штаммы часто различаются по нескольким *het*-генам, большинство из них взаимно несовместимы. У *Aspergillus nidulans* несовместимость проявляется в снижении гетерокариотичных (мозаичных) конидиальных головок при сращивании штаммов, маркированных окраской конидий (*yellow*, *white* и др.). Среди природных штаммов выделено более 20 взаимно несовместимых *h-c* (*heterokaryon-compatibility*) групп. Поскольку гетерокарионная несовместимость в большинстве случаев не препятствовала половой гибридизации, был проведен гибридологический анализ несовместимости. Если несовместимость контролируется одним геном с двумя аллелями, то лишь половина потомков будет совместима с одним или другим родителем; при наличии *k* не сцепленных локусов несовместимости доля совместимых с родителями потомков составит $2 \times (1/2)^k$. Степень совместимости оказалась обусловленной числом гетероаллельных локусов у сращиваемых штаммов, вследствие чего можно получить серию гибридов с варьированием несовместимости (от незначительного снижения числа гетерокариотичных головок до полного их отсутствия).

Наиболее сложный генетический контроль вегетативной несовместимости описан у *Podospora anserina*. Пять локусов этого гриба — *B*, *Q*, *S*, *C*, *W* — фенотипически сходны с *het*-генами *N. crassa*: если два штамма гетероаллельны по какому-либо из них, на границе колоний возникает линия барража. Как и у *N. crassa*, эти гены не влияют на протекание полового процесса, за исключением локуса *C*, гетероаллельность по которому подавляет также формирование перитециев. Наиболее интересен локус *het-s*. Потомство от скрещивания гетероаллельных штаммов [*Het-S*] и [*Het-s*] расщепляется на два класса: [*Het-S*] и нейтральный [*Het-s**], совместимый с обоими родителями. При сращивании [*Het-s**] с [*Het-s*] происходит превращение первого во второй. Такое превращение с низкой частотой может происходить и спонтанно. Скрещивание этих штаммов дает в потомстве только [*Het-s*], если этот штамм был материнским (перитециальным), и [*Het-s**], если [*Het-s*] был отцовским, т.е. имеет место феномен неядерного наследования.

Однако митохондрии не принимают участия в регуляции данного фенотипа. Поэтому было сделано предположение о том, что белок, кодируемый *het-s*, способен индуцировать и регулировать собственный синтез. Этот белок имеет свойства приона, ибо: 1) белок необходим для превращения фенотипа [*Het-s**] в [*Het-s*]; 2) перепродукция гена белка *het-s* ускоряет такое превращение; 3) превращение происходит в отсутствие трансляции; 4) физи-

ко-химические свойства белка *het-s* сходны с свойствами других грибных прионных белков (PSI и URE3 дрожжей). Прионы — инфекционные белки, которые возникают из нормальных клеточных белков, но потеряли свои функции и приобрели способность конвертировать нормальный белок в себе подобную форму. Белок рНЕТ-s имеет отличия от рНЕТ-S в 14 аминокислотах из 289, причем показано, что его свойства могут меняться при замене только одной аминокислоты (цистеина на пролин в положении 33).

Помимо аллельной несовместимости, штаммы *P. anserina*, выделенные из разных районов Франции и Германии, несовместимы вследствие взаимодействия в смешанной цитоплазме продуктов неаллельных генов. Пять таких генов (*c*, *d*, *e*, *r*, *V*) обнаружены у природных изолятов и четыре гена (*f*, *g*, *k*, *l*) выявлены с помощью искусственного мутагенеза. Несовместимая реакция развивается при взаимодействии продукта гена *c* расы S с продуктами генов *d* и *e* расы A; гена *c* расы A — с продуктом гена *e* расы F; гена *r* и гена *V*, а также при аллельном взаимодействии *V/v*. Взаимодействия между штаммами, имеющими разные аллели неаллельных генов несовместимости *c*, *e* и *d*, показаны в табл. 26.

Неаллельные взаимодействия проявляются не только в вегетативной, но и в половой несовместимости: если два штамма различаются одной парой неаллельных генов, то перитеции развиваются только с одной стороны вдоль демаркационной линии между колониями, а с другой отсутствуют. При различиях по двум парам генов перитеции не развиваются вовсе. Стерильность обусловлена деструкцией трихогины при ее слиянии с микроконидиями, т.е. сходна по физиологическому механизму с гаметофитной несовместимостью высших растений. Унилатеральный перенос факторов несовместимости наблюдается и в вегетативных клетках: при слиянии гиф, имеющих ядра с генами *rV* и *Rv*, лизируются только одна, ближайшая к анастомозирующей клетка штамма *rV* и более 100 клеток штамма *Rv*, т.е. погибают *R*-, но не *V*-клетки.

Таблица 26. Взаимодействия между аллелями локусов *c*, *e* и *d* *P. anserina* (S. S. Sauple et al., 1994)

<i>het-c</i>	<i>het-e</i>			<i>het-d</i>	
	<i>e1</i>	<i>e2</i>	<i>e3</i>	<i>D1</i>	<i>d2</i>
<i>c1</i>		H	H		
<i>c2</i>	H			H	
<i>c3</i>		H			
<i>c4</i>		H	H	H	H

Примечание. H — реакция несовместимости.

Получена серия мутантов, в разной степени ослабляющих самонесовместимость, обусловленную присутствием в геноме генов несовместимости *het-c*, *het-e*, *het-d*. Эти мутации обозначены символом *mod* (modification). Продукт гена *modD* гомологичен аденилциклазе *N.crassa*. Он вызывает автолиз гиф в старых колониях, который подавлялся ингибитором протеаз фенилпироватом или присутствием мутации *modC* — ингибитора несовместимости в системе *het-R/het-V*. Все гены *mod* ингибируют образование трихогины, вследствие чего их носители имеют женскую стерильность.

Ряд генов неаллельной несовместимости клонированы. Белок HET-C, состоящий из 208 аминокислот, осуществляет перенос липидов от донора на акцептор, находящийся на мембране. Он необходим для поддержания нормальной композиции мембран, транспорта везикул в клетки и, возможно, для организации цитоскелета. Огромный (1056—1356 аминокислот) белок HET-E имеет два домена. Один из них, гомологичный белкам TOL и HET6 *N. crassa*, содержит сайт связывания с ГТФ (Р-петлю), причем мутации, нарушающие связывание ГТФ, одновременно нарушают функцию несовместимости. Поскольку продукты обоих генов несовместимости (*het-c* и *het-e*) принимают участие в трансдукции сигнала (первый участвует в транспорте гликолипида церамида — медиатора стрессорных ответов и апоптоза, второй связывает ГТФ), полагают, что несовместимая реакция может быть обусловлена конститутивной активацией сигнальной системы, приводящей к апоптозу.

В системе V/R идентифицированы два гена, вызывающие лизис — *lyt1* и *lyt2*; их активность подавлена в присутствии *mod*-мутаций.

Как видно, гены, влияющие на вегетативную несовместимость, разнообразны по функциям, а сама несовместимость разнообразна по своей природе. Она может быть вызвана дефектами мембран внутриклеточных везикул, которые собраны в смешанной цитоплазме продуктами разных генов, блокированием микротрубочек, ответственных за миграцию ядер, и, возможно, другими процессами.

Экологическая и популяционная роль вегетативной несовместимости

Вегетативная несовместимость широко распространена у грибов, принадлежащих к разным таксонам. Популяции многих грибов распадаются на большое число вегетативно совместимых (*v-c*) групп, что приводит к взаимной изоляции находящихся по соседству колоний. По-видимому, имеются какие-то факторы, се-

лектирующие гены вегетативной несовместимости и обуславливающие их накопление в популяциях.

Среди гипотез, объясняющих экологическую роль вегетативной несовместимости, наиболее обоснована гипотеза о ее защитной функции — *защита от автономно-реплицирующихся цитоплазматических элементов*. В цитоплазме грибов обнаружено большое число автономно-реплицирующихся элементов (плазмид, вирусов); некоторые из них снижают приспособленность своих хозяев, вызывая такие явления, как гиповирулентность, старение и др. Ни один из этих элементов, включая покрытые белковыми капсидами вирусы, не способен заражать гифы из внешней среды (апопластно). Известны лишь два пути их распространения в грибных популяциях: вертикальный — через споры от родителей потомкам и горизонтальный — через анастомозы между гифами двух рядом растущих штаммов. Защитой от вертикальной передачи служит половой процесс, ибо некоторые типы двухцепочных ДНК- и РНК-содержащих плазмид, например *d*-фактор *Ophiostoma ulmi*, не попадают в мейоспоры. Защита от горизонтального переноса — цитоплазматическая несовместимость, так как эффективность передачи инфекции через зону барража снижается или она не передается совсем.

О роли несовместимости в защите от заражения плазмидами свидетельствуют следующие данные: внутри одной гавайской популяции *Neurospora intermedia* 9 штаммов, содержащих плазмиду *kalilo*, были вегетативно несовместимы с каждым из 20 проверенных штаммов, свободных от плазмиды. Другой пример — попытки использовать зараженные двухцепочной (дц) РНК гиповирулентные штаммы возбудителя рака каштанов *Cryphonectria (Endothia) parasitica* для защиты каштановых лесов от болезни. При сращивании двух штаммов dsРНК переходит через анастомоз из гиповирулентного штамма в вирулентный, делая его тоже гиповирулентным. Заражая больные деревья гиповирулентными штаммами, удалось вылечить каштаны во Франции и Италии. Однако в ряде районов Северной Америки лечение оказалось неудачным. Отчасти это обусловлено значительно большим числом взаимно несовместимых *v*-с-групп в Америке по сравнению с Европой.

Степень подавления передачи определяется числом гетерогенных локусов несовместимости у сращиваемых штаммов. Различия по одной паре аллелей у *S. parasitica* и *Ophiostoma ulmi* частично снижает миграцию дцРНК, а различия по многим локусам полностью предотвращают миграцию. У *Neurospora crassa* различия по гену *het-c* более эффективно препятствуют транспорту плазмиды *kalilo*, чем различия по генам *het-d* *het-e* и *mat*.

ЧАСТЬ IV

ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ ГРИБОВ

Глава 8

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ СЕЛЕКЦИИ ГРИБОВ

Грибы представляют непосредственный практический интерес в нескольких аспектах:

- они синтезируют различные метаболиты, полезные для человека;
- в мицелии и плодовых телах накапливается пищевой или кормовой белок и иные питательные продукты;
- грибы нематофаги, энтомопатогены, мико- и фитофилы используются для биологической защиты растений от вредных организмов.

Во всех случаях человек в XX в. перешел от собирательства и случайного использования грибов и их продуктов к культивированию. Однако культивирование микроорганизмов не может быть успешным при низком выходе того продукта, ради которого они культивируются.

Повышению продуктивности и, следовательно, рентабельности микробиологического производства служат *селекция*, т. е. увеличение генетического вклада в продуктивность, и *технология*, т. е. увеличение вклада, обусловленного условиями роста, выращивание в таком режиме, при котором наследственные потенции проявляются в наивысшей степени. Оба эти приема важны и взаимно незаменимы.

Селекция продуцентов грибных метаболитов

Грибы выращивают ради получения органических кислот, витаминов, ферментов, антибиотиков, алкалоидов, ростовых гормонов. Как известно, все метаболиты условно разделяют на *первичные* и *вторичные*.

Такое разделение условно, так как сейчас известно, что большинство вторичных метаболитов образуется вследствие реорганизации первичных. Например, β -лактамовые антибиотики (пенициллины и цефалоспорины) — продукты реорганизации трех аминокислот.

Первичные метаболиты

Регуляция синтеза

Первичные метаболиты необходимы для роста организма и незаменимы. К ним относятся нуклеиновые кислоты, белки, углеводы, коферменты, липиды и др. Они возникли на ранних этапах биохимической эволюции, поэтому пути их синтеза сходны у разных групп организмов (даже у про- и эукариот). Мутация, приводящая к потере фермента, участвующего в синтезе первичного метаболита, приводит к перекрыванию пути синтеза на этом этапе и накоплению промежуточного метаболита, неспособного трансформироваться дефектным ферментом. Такой метаболит очень редко может быть использован в боковом шунте. Все это свидетельствует о высокой специфичности ферментов к их нормальным субстратам и вместе с тем позволяет по накоплению промежуточных продуктов у независимо полученных мутантов изучать пути биосинтеза. Такой прием был впервые применен при изучении биохимических мутантов *Neurospora crassa* американскими генетиками Дж. Бидлом и Э. Тейтумом, которые за эту работу получили в 1958 г. Нобелевскую премию. В 1957 г. англичанин Дж. Финч у того же гриба разработал метод изучения тонкой структуры гена, названный *межаллельной комплементацией*.

Поскольку генетическая регуляция метаболизма первоначально была исследована у прокариот и прокариотные модели регуляции приведены во многих учебниках, отметим особенности регуляции у грибов по сравнению с прокариотами.

■ У прокариот функционально связанные гены, участвующие в биосинтезе продукта, собраны в гроздь (кластер) — *оперон*. Согласно расчетам М. Демереца, 70 % генов *Salmonella* образуют кластеры из двух и больше функционально связанных генов. В частности, гистидиновый оперон включает 9 генов, продукты которых (ферменты) управляют синтезом гистидина. У грибов хотя и обнаружена оперонная организация генов, чаще они расположены независимо. Те же 9 генов синтеза гистидина у *N. crassa* разбросаны по четырем хромосомам.

■ У прокариот в основном наблюдается негативный контроль синтеза. Оперонная модель включает участие гена-регулятора, его продукта — репрессора, связывающегося с оператором и выключающего промотор структурных генов. У грибов при наличии негативного контроля более часто обнаруживается позитивный. Р. Мезенберг высказал на этот счет следующие соображения. Объем клетки кишечной палочки составляет 10^{-15} л. У нейроспоры генов примерно в 10 раз больше, а объем клетки больше на 3 порядка. Механизм негативного контроля требует постоянного синтеза репрессорных молекул для того, чтобы держать выключенными мно-

гис гены. Если бы у эукариот негативный контроль был правилом, то каждый репрессор присутствовал бы в концентрации, сравнимой с лактозным репрессором *Escherichia coli* — $2 \cdot 10^{-8}$ М. У *E. coli* около 1000 регуляторных систем, а у *N. crassa* их в 10 раз больше. Концентрация репрессорных молекул при этом составила бы $2 \cdot 10^{-4}$ М. Если средняя молекула белка имеет молекулярную массу 10^5 Да, то концентрация регуляторного белка должна составлять 20 мг/мл, а осмотическое давление, вызванное ими, 4 торр. Поскольку рН кислых аминокислот может отличаться от клеточного, для их нейтрализации требуются ионы K^+ , что еще больше увеличит осмотическое давление. Таким образом, осмотические условия существования эукариотной клетки не позволяют доминировать негативной регуляции метаболизма. Кроме того, позитивный контроль более эффективен. Так, активности полностью репрессированного и дерепрессированного *lac*-оперона кишечной палочки различаются в 1000 раз, в то время как различия с активностью щелочной фосфатазы *N. crassa* составляет 10 000 раз. Отсюда следует, что позитивный контроль более эффективен, хотя и осуществляется меньшим числом молекул.

■ Часто первый структурный ген запускает работу остальных генов системы, будучи одновременно элементом позитивного контроля. Например, активность генов синтеза лейцина *leu-4*, *leu-2* и *leu-1* скоординирована таким образом, что в зависимости от концентрации лейцина в среде продукция всех трех ферментов колеблется одинаково. Мутант по *leu-4* лишен не только первого фермента в цепи биосинтеза, но и других ферментов даже в условиях лейцинового голодания. Фермент *Leu-4* осуществляет синтез α -изопропилмалата — позитивного контролера регуляторного гена *leu-3*.

■ В связи с тем, что в грибной клетке могут находиться несколько ядер, для грибов характерен также ядерно-лимитированный контроль. Если контрольный элемент (позитивный или негативный) не диффундирует через ядерную мембрану, то в гетерокариотической клетке с нормальными и мутантными по регулирующему гену ядрами будут наблюдаться явления репрессии одними ядрами и дерепрессии другими.

Примеры генетической регуляции метаболизма у грибов

Регуляция катаболизма хинной кислоты у *Neurospora crassa*. Хинная кислота — обычный растительный продукт, который является хорошим источником углерода для грибов, разрушающих растительные остатки. В утилизации хинной кислоты участвует

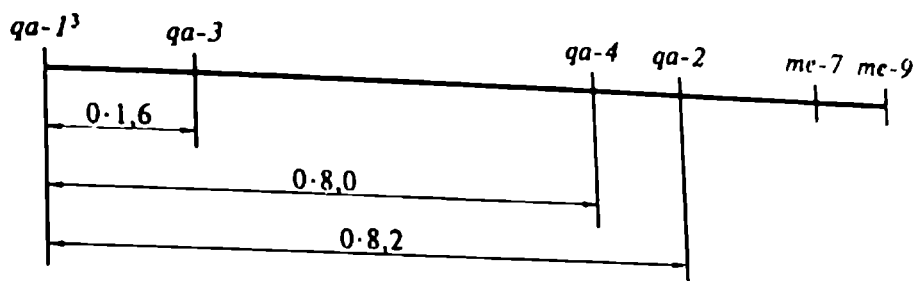


Рис. 66. Генетическая карта кластера генов *qa*.
Цифрами показаны проценты прототрофов, возникших при скрещиваниях мутантов

кластер генов, расположенных вблизи центromеры правого плеча хромосомы VII, размером 17,3 тыс. н.п. В кластере обнаружены структурные гены, продукты которых участвуют в катаболизме хинной кислоты, — *qa-2*, *qa-3*, *qa-4* (рис. 66), и регуляторный ген *qa-1*. Порядок расположения генов в кластере: *qa-1* — *qa-3* — *qa-4* — *qa-2*. Участие структурных генов *qa-2*, *qa-3* и *qa-4* в последовательных этапах превращения хинной кислоты в протокатеховую показана на рис. 67. Ген *qa-1* в присутствии хинной кислоты образует продукт, взаимодействующий со структурными генами. Этот продукт диффундирует между ядрами, так как мутант по регуляторному гену комплементируется в гетерокарионах, дефектных по структурным генам. Получены мутанты с разной степенью комплементации. Быстро и полно комплементирующиеся

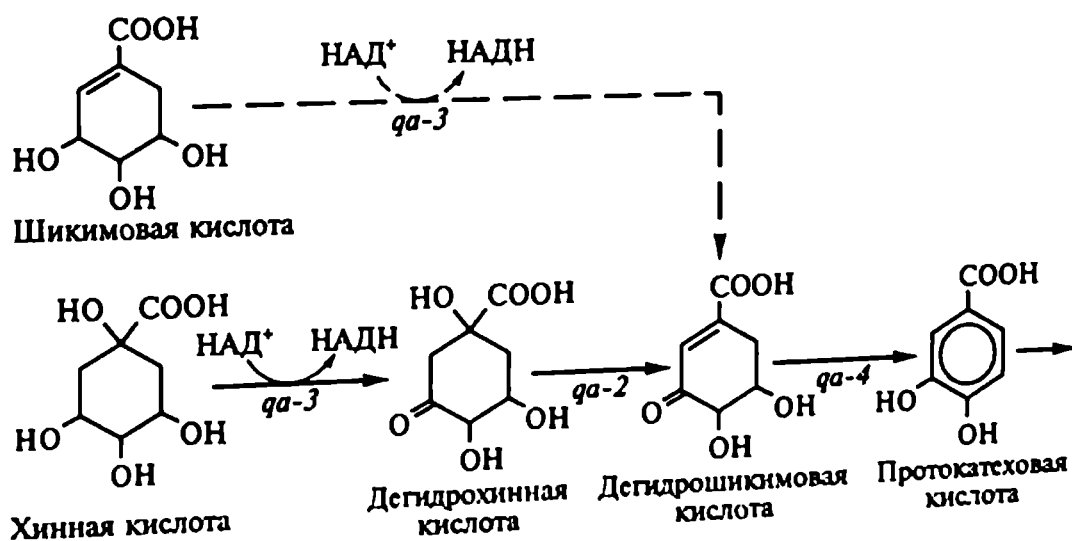


Рис. 67. Катаболизм хинной кислоты (R. L. Meizenger, 1979).
Три структурных гена, кодирующих ферменты катаболизма, обозначены под стрелками. Дальнейшее окисление протокатеховой кислоты осуществляется под контролем иных генетических систем

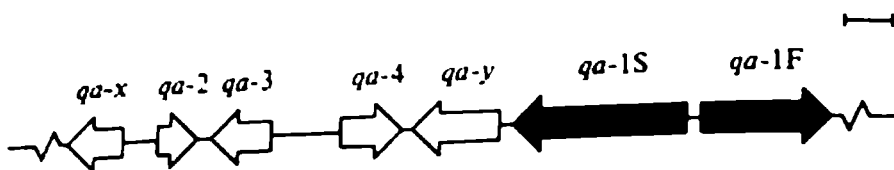


Рис. 68. Генетическая организация кластера *qa*-генов.

Пять структурных и два регуляторных гена (*qa-1S* и *qa-1F*) формируют кластер размером 17,3 тыс. н.п. Стрелками указаны направления транскрипции каждого гена

мутанты названы *qa-1^F*, медленно и не полностью комплементирующиеся — *qa-1^S*. Мутации в области *qa-1^S* приводят к конституционной активности структурных генов даже в отсутствие хинной кислоты. Наоборот, в области *qa-1^F* получена мутация (*qa-1^C*), не индуцируемая хинной кислотой. Картирование кластера показало, что область *qa-1* включает два гена — *qa-f*, продуцирующий в присутствии хинной кислоты белок-активатор, и *qa-s*, продуцирующий репрессор (рис. 68). Активатор связывается с консервативным участком размером 28 н.п., имеющимся у всех трех структурных генов, и индуцирует их экспрессию. Репрессор содержит два домена — *qa-S* и *qa-Y*: первый взаимодействует с хинной кислотой, второй — с активатором.

В отсутствие хинной кислоты связывание репрессора с активатором выключает индукцию последним структурных генов. Хинная кислота делает репрессор неактивным по отношению к активатору, который включает экспрессию структурных генов. Уровень индукции регуляторных генов хинной кислотой отличается примерно в 50 раз, а структурных — до 10 тыс. раз. В кластер входит также ген *qa-X*, ответственный за катаболитную репрессию. При наличии в среде энергетически более выгодного катаболита (например, глюкозы) уровень активности ферментов падает до 10 %.

Регуляция синтеза ароматических аминокислот у *N. crassa*. Система аром представлена расположенными на правом плече хромосомы II пятью сцепленными генами, которые контролируют ферменты, необходимые для синтеза ароматических аминокислот (фенилаланина, тирозина и триптофана) и витамина парааминобензойной кислоты (ПАБК) (рис. 69). Порядок генов (промотор — *arom-2* — *arom-4* — *arom-5* — *arom-9* — *arom-1*) не соответствует последовательности ферментативных реакций при биосинтезе. По каждому гену получены *missence*-мутации, не влияющие на экспрессию соседних генов. На матрице этих генов синтезируются гигантская мРНК и полипептид с молекулярной массой 230 000 — полифункциональный димер, каждый мономер которого состоит из пяти доменов. По каждому гену описано много межallelных комплементаций, происходящих вследствие нали-

чия двух идентичных мономеров у всех полипептидов, входящих в агрегат.

Помимо простых мутаций описаны плеiotропные, снижающие или подавляющие активность всех пяти ферментов. Они не комплементируются с простыми и картированы в генах *arom-2* и *arom-4*. По-видимому, они представляют собой высокополярные *нонсенс*-мутации, расположенные вблизи точки инициации транскрипции. Гены, входящие в кластер, конститутивны и подвержены аллостерической регуляции ароматическими аминокислотами, которая осуществляется на уровне синтеза предшественника дезоксиарабиногептулозонат-7-фосфата (ДАГФ). Он катализируется тремя изоферментами, находящимися под контролем трех генов (*arom-6*, *arom-7*, *arom-8*), не сцепленных с *arom*-кластером. Синтез каждого изофермента репрессируется при наличии в среде одной из трех ароматических аминокислот.

Катаболитная репрессия углеводов у *Saccharomyces cerevisiae*. Катаболитная репрессия обусловлена тем, что в присутствии энергетически менее затратного источника углерода (глюкозы) ферменты, необходимые для утилизации более затратного (альтернативного) источника, отсутствуют или синтезируются в низкой концентрации (табл. 27).

Наряду с катаболитной репрессией у дрожжей имеет место *катаболитная инактивация* — протеолиз определенных ферментов.

Так, глюкоза вызывает быстрое фосфорилирование и протеолитическую деградацию фруктозо-1,6-бисфосфатазы вследствие переноса этого фермента в вакуоль и деградации высокополярными протеазами.

В качестве примера катаболитной репрессии рассмотрим регуляцию углеводами генов *GAL*, участвующих в катаболизме галактозы.

В присутствии галактозы как единственного источника углерода активизируется ряд генов:

1) ген *GAL2* кодирует синтез фермента пермеазы, который осуществляет перенос галактозы через мембрану;

2) ген *GAL4*, продукт которого — активатор транскрипции серии генов (*GAL1*, *GAL2*, *GAL7*, *GAL10*, *MEL1*), участвующих в катаболизме галактозы и мелибиозы (рис. 70); эти гены содержат регуляторный элемент UAS_{GAL} , с которым взаимодействует димеризованная форма белка Gal4, однако в димеризованном состоянии Gal4 формирует комплекс с белком Gal80, не способный активировать экспрессию галактозных генов;

3) ген *GAL3* контролирует галактокиназу; белок Gal3 связывается с белком Gal80, освобождая тем самым регулятор транскрипции галактозных генов Gal4.

Таблица 27. Катаболическая репрессия у *S. cerevisiae*, вызванная различными сахарами (J. M. Gancedo, 1998)

Источник углерода	Активность ферментов, mU/мг белка					
	малат-синтаза	фруктозо-бисфосфатаза	изоцитрат-лиаза	цитохром-оксидаза	малат-дегидрогеназа	глутамат-дегидрогеназа
Глюкоза	1	1	1	6	450	1
Галактоза	1	1	1	19	700	8
Пируват	180	40	80	38	11 000	53

При наличии в среде глюкозы снижается транскрипция *GAL2* (пермеазы) и, следовательно, поступление галактозы в клетку и активация ею галактозных генов. В частности, в репрессированном состоянии находится ген *GAL3*, вследствие чего регулятор Gal4 находится в неактивном комплексе с Gal80. Синтез Gal4 также подавлен вследствие связывания регуляторного белка Mig1 с промотором гена *GAL4*. В отсутствие глюкозы белок Mig1 фосфорилируется протеинкиназным комплексом Snf1 и мигрирует из ядра в цитоплазму. Глюкоза инактивирует комплекс Snf1, вследствие чего Mig1 остается в ядре и связывает ген *GAL4*. Упрощенная схема индукции галактозных генов приведена на рис. 71. В результате репрессии этих процессов глюкозой активность *GAL*-генов уменьшается примерно в 1000 раз.

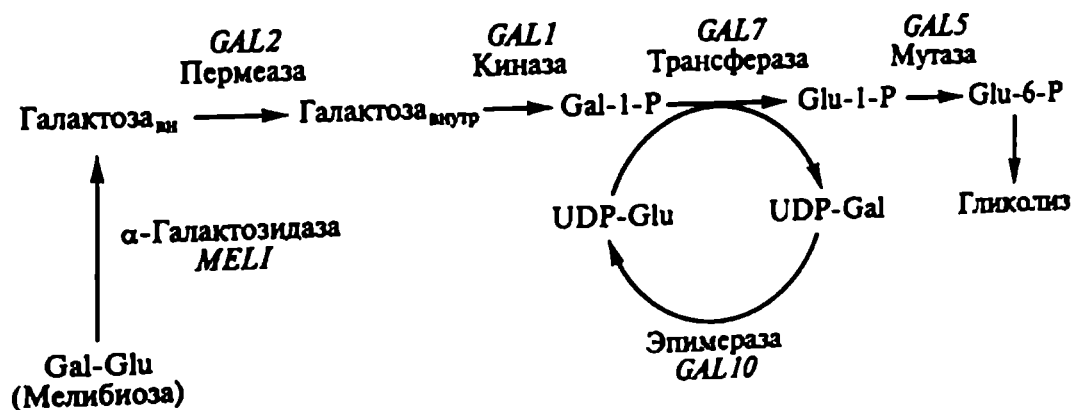


Рис. 70. Утилизация галактозы.

Этапы процесса: расщепление мелибиозы (ген *mell*, фермент — α -галактозидаза); транспорт галактозы в клетку (ген *gal2*, фермент — пермеаза); фосфорилирование галактозы (ген *gal1*, фермент — галактокиназа); трансформация галактозо-1-фосфат в глюкозо-1-фосфат (гены *gal7* и *gal10*, ферменты — галактозо-1-фосфатуридинилтрансфераза и уридиндифосфоглюкозо 4-эпимераза); образование глюкозо-6-фосфата (ген *gal5*, фермент — фосфоглюкомутаза)

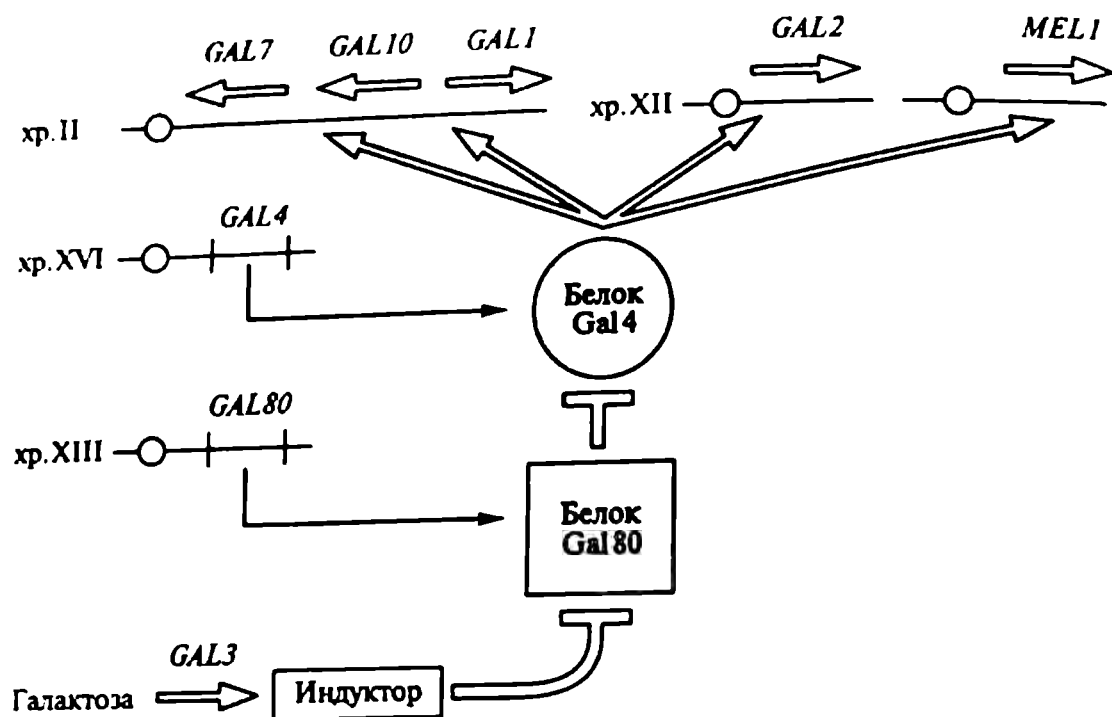


Рис. 71. Регуляция активности галактозных генов.

Объяснение см. в тексте (хр — хромосома)

Метаболитная репрессия утилизации фосфора у *N. crassa*. Главным источником фосфора для природных штаммов *N. crassa* являются нуклеиновые кислоты из убитых высокой температурой растений. Метаболизм, поступление и утилизация нуклеиновых кислот проходят ряд этапов: 1) гидролиз до эфиров монофосфата нуклеазами; 2) гидролиз этих эфиров кислой фосфатазой и 5'-нуклеотидазой (в окружающей среде) и щелочной пермеазой (в периплазме); 3) транспорт фосфата в клетку фосфат пермеазой и фосфорилэтаноламин пермеазой. Экспрессия всех этих ферментов подвержена метаболитной репрессии неорганическим фосфатом. Например, два структурных гена — *pho-1* (синтез щелочной фосфатазы) и *pho-2* (синтез кислой фосфатазы) не сцеплены друг с другом и с регуляторными генами *nuc-2*, *nuc-3*, *preg*. Ген *nuc-1* контролирует синтез позитивного контролирующего элемента, запускающего экспрессию структурных генов на уровне транскрипции. Белок Preg (phosphate regulation) репрессирует транскрипцию гена *nuc-1* (негативный контроль), а белок Nuc2, с одной стороны, репрессирует экспрессию гена *preg*, а с другой — является мишенью действия неорганического фосфата (рис. 72). Такая каскадная регуляция приводит к тому, что в условиях фосфатного голодания активность ферментов увеличивается в 10 000 раз.

Метаболитная репрессия утилизации азота у грибов. Многие грибы способны утилизировать широкий набор источников азота

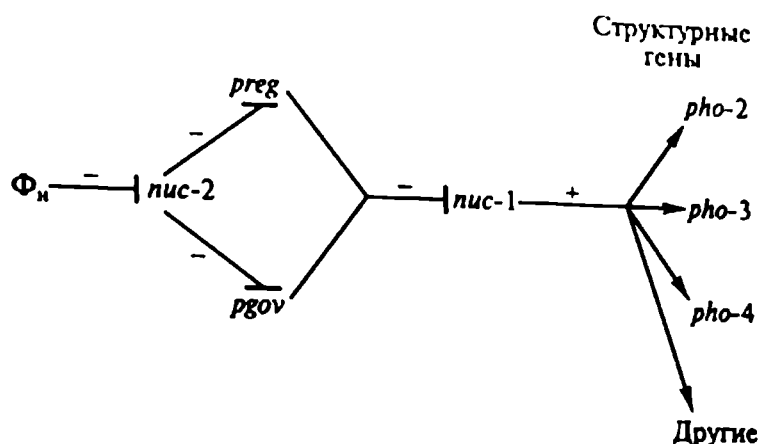
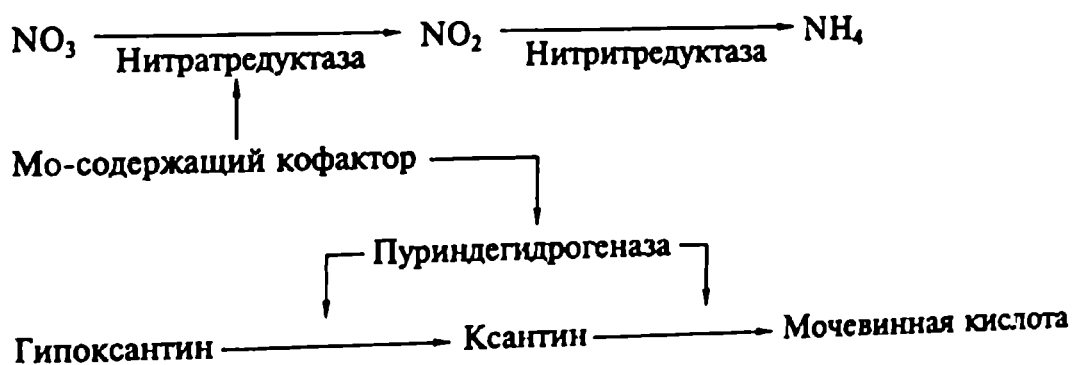


Рис. 72. Модель регуляции семейства структурных генов, осуществляющих метаболизм фосфата (*pho-2*, *pho-3*, *pho-4* и др.) (R. L. Melzenberg, 1982).

Эти гены находятся под позитивным контролем продукта гена *nuc-1*, который в свою очередь инактивируется продуктами генов *preg*, *pgov*. Эти гены репрессируют продукт гена *nuc-2*, транскрипцию которого репрессирует неорганический фосфат ($\Phi_{и}$)

в среде, включая нитратный азот, которые в результате серии метаболических шагов восстанавливаются до аммония, а последний включается в синтез аминокислот и других азотсодержащих органических соединений. В превращении нитратного азота в аммонийный принимает участие ряд ферментов:



Для функционирования первого структурного фермента, восстанавливающего нитратный азот — нитратредуктазы, необходим кофактор, содержащий молибден и входящий также в состав фермента ксантиндегидрогеназы, который участвует в катаболизме пуринов. Нитратредуктаза переносит на нитрат два электрона: один — от НАДФ через ФАД и цитохром *b*₅₇, второй — от молибденсодержащего кофактора.

Нитритредуктаза восстанавливает нитрит до аммония. У *N. crassa* гены, кодирующие нитрат- и нитритредуктазы (NIT3, NIT6), не сцеплены, а у *Aspergillus nidulans* (NIAD и NIAA) тесно

Таблица 28. Символы генов, ответственных за утилизацию азота у грибов

Функция	<i>N. crassa</i>	<i>A. nidulans</i>	<i>Fusariumoxysporum</i>
Структурный ген нитрат-редуктазы	NIT3	NIAD	NIT1
Структурный ген нитрит-редуктазы	NIT6	NIAA	
Ген синтеза Мо-кофактора	NIT1 NIT7 NIT8 NIT9	CNXABC CNXE CNXF CNXG	NITM
Ген специфической индукции	NIT4	CNXH	NIT3
Ген метаболитной репрессии	NIT2	NIRA AREA TAMA	

сцеплены. Оба гена индуцируются нитратом и репрессируются аммонием. Ген *N. crassa* NIT4 — медиатор специфической субстратной индукции нитратом, а NIT2 — специфической репрессии аммонием. За синтез и сборку содержащего молибден кофактора ответственны четыре гена, в том числе сложный локус, состоящий из трех комплементационных групп (NIT9 *N. crassa*, CNXABC *A. nidulans*) (табл. 28).

Экспрессия AREA (ammonium repression) и NIT2 регулируется уровнем глутамина в клетках. Однако ArgA-белок участвует не только в регуляции нитратного метаболизма, но и в других процессах, связанных с утилизацией азота из разных источников. Метаболитной репрессии азота подвержено более 100 генов *A. nidulans*. Например, ArgA-репрессор участвует в регуляции катаболизма пролина как источника азота и углерода. Пролин активизирует продукт первого гена пролинового кластера PRNA, который стимулирует экспрессию структурных генов PRNB (пермеаза), PRND (пролиноксидаза) и PRNC (дегидрогеназа). С помощью этих ферментов пролин транспортируется в клетку и трансформируется до глутамина. В центре кластера находится регуляторная область, содержащая 4 сайта узнавания: 1) сигнала индуктора PmA; 2) продукта гена AREA; 3) продукта гена CREA (carbon catabolite repression) и 4) РНК-полимеразы. Мутации, нарушающие сайты связывания с катаболитным репрессором углерода CreA и дерепрессирующие катаболизм пролина как источника углерода, влияют и на регуляторные функции ArgA.

Белок ArgA имеет структуру, встречающуюся у регуляторных белков различных эукариотных организмов и названную GATA. Эта область включает 2 аминокислотных остатка (от 671 до 722) и содержит последовательность, хелатирующую Zn^{++} (zinc finger). Получено и картировано много мутаций, влияющих на степень связывания GATA области с промоторным участком ДНК.

Селекция

Селекция продуцентов аминокислот, витаминов, азотистых оснований. Наилучшим методом селекции продуцентов аминокислот, азотистых оснований и других промежуточных продуктов является получение мутаций, приводящих к блокированию определенных стадий биосинтетического пути. Это может привести к накоплению промежуточного продукта, который в связи с блоком последующей стадии биосинтеза будет не утилизироваться, а накапливаться. Например, мутанты *Saccharomyces cerevisiae*, *Coprinus cinereus*, *Flammulina velutipes*, ауксотрофные по гуанину, накапливают его предшественники ксантины.

Второй принцип селекции заключается в том, что генетический блок в синтезе одного конечного продукта в разветвленном пути биосинтеза приводит к накоплению другого конечного продукта. Например, мутант *Ustilago maydis*, ауксотрофный по лейцину, накапливает в высокой концентрации (до 6 мг/мл среды) метионин. Другой пример — ауксотрофные по гистидину и метионину мутанты *Hansenula sp.* синтезировали до 6 мг/мл триптофана на среде, содержащей необходимый источник роста в ограниченной концентрации. Мутант *Candida guilliermontii*, у которого был блокирован синтез предшественников пуринов, накапливал рибофлавин до 39 мг/мл среды. Генетический блок мутанта связан с образованием раннего предшественника пуринов 5'-амино-4-имидазокарбоксандриботида.

Выход необходимого продукта может быть увеличен активацией ферментов, необходимых для синтеза его предшественников. Например, один из предшественников рибофлавина — аминокислота глицин — образуется у большинства организмов двумя путями: 1) из серина с помощью фермента сериноксиметилтрансферазы; 2) из треонина с помощью фермента треонинальдолазы (это менее распространенный путь). Последний путь является основным для сахаромилетных дрожжей, растущих на среде с глюкозой. Аскомицет *Aeshbya gossypii* — промышленный продуцент рибофлавина (дает выход продукта до 15 г/л) — был трансформирован плазмидой, в которой ген треонинальдолазы из *Saccharomyces cerevisiae* (*GLY1*) был соединен

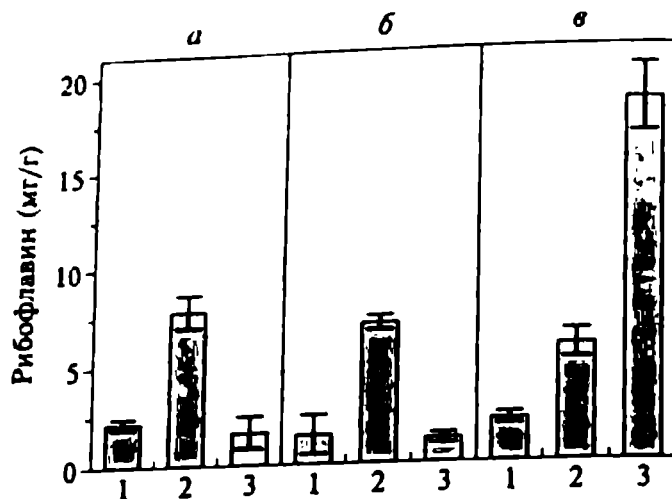


Рис. 73. Продукция рибофлавина (мг/г сухого веса мицелия) *Aeshbya gossypii* в жидкой питательной среде без добавления аминокислот (1), с добавлением 80 мМ глицина (2) и 50 мМ тренина (3) (P. Moonschau et al., 1998):

а — дикий тип; б — раG203; в — раG203GLY1

с конститутивным промотором *TEF*, чем достигалась сверхпродукция фермента. Продукция трансформированного штамма не отличалась от продукции исходного при росте на средах без добавления аминокислот и с добавлением глицина, но увеличивалась на порядок при выращивании на среде с треонином (рис. 73).

Селекция продуцентов ферментов. В основе мутагенной селекции, направленной на повышение продукции ферментов, лежит использование четырех классов абберантной генетической информации. Каждый из них может иметь неодинаковое потенциальное влияние на накопление ферментного белка: 1) мутантные нуклеотидные последовательности ДНК структурных генов (обычно миссенс-мутации); 2) мутантные нуклеотидные последовательности ДНК регуляторных генов (промотор-мутации); 3) дубликации нуклеотидных последовательностей ДНК структурных генов; 4) дубликации нуклеотидных последовательностей ДНК регуляторных генов. Теоретически наиболее благоприятны для увеличения выхода ферментов мутации 2-го и 3-го типов. Мутации в регуляторном гене могут привести к его выключению. При этом фермент из индуцибельного становится конституционным. Например, синтез целлюлазы, гидролизующей глюкозиды у *N. crassa*, индуцируется введением в среду некоторых глюкозидов. Штамм с мутацией *cell-1* не нуждается в индукторе. Мутации в регуляторных генах могут привести к снятию репрессии образования необходимых ферментов. Так, синтез инвертазы у дрожжей репрессируется глюкозой. Был получен мутант, у которого инвер-

таза не репрессируется глюкозой и составляет 1 — 2 % общего белка.

Дупликация структурного гена может привести к увеличению синтеза фермента, который в этом случае будет идти на большем числе копий мРНК.

В последние десятилетия основным методом получения штаммов, активных продуцентов ферментов, стали генно-инженерные работы. В качестве примера можно привести исследования по получению штаммов дрожжей, более активно ферментирующих растительные полисахариды. Получение этанола из растительного сырья рассматривается как экологически безопасная и возобновляемая альтернатива продуктам переработки нефти. Из двух главных моносахаров гидролизата целлюлозы — гексозы глюкозы и пентозы ксилозы — сахаромицетные дрожжи могут превращать в этанол только глюкозу. Другие виды дрожжей, такие, как *Pichia stipitis* и *Candida shehatae*, способны ферментировать ксилозу до этанола вследствие наличия ферментов ксилоредуктазы (XR, конвертирует ксилозу до ксилита), ксилитдегидрогеназы (XDH, конвертирует ксилит в изомер ксилозы — ксилулозу) и ксилулокиназы (XK, образует ксилулозо-5-фосфат, который в дальнейшем включается в пентозофосфатный путь метаболизма).

Сахаромицетные дрожжи могут сбраживать ксилулозу, но уровень сбраживания слабый из-за низкой активности XK.

Были сконструированы рекомбинантные плазмиды, которые наряду с доминантными селективными маркерами (генами резистентности к генетицину и ампициллину) содержали 3 гена метаболизма ксилозы — XR, XDH (из *Pichia stipitis*) и XK (из *Saccharomyces cerevisiae*). Трансформированный такими плазмидами штамм дрожжей мог коферментировать глюкозу и ксилозу; находящиеся на плазмиде гены не требовали ксилозы в качестве индуцирующего фактора и не супрессировались глюкозой. Полученный штамм активно утилизировал ксилозу для анаэробного роста, продуцируя в качестве побочного продукта ксилит.

Из генома многих бактерий клонирован ген *xylA*, контролирующий синтез изомеразы ксилозы (ИК), которая катализирует прямую изомеризацию ксилозы в ксилулозу. Он был перенесен из бактерии *Thermus thermophilus* в *S. cerevisiae* на репликативной плазмиде, однако рекомбинантный штамм продуцировал ксилит, который ингибирует синтез ИК. Образование ксилита у сахаромицетных дрожжей катализирует неспецифический фермент альдозоредуктаза (AP), кодируемая геном *CRE3* на хромосоме VIII. Делетирование гена *CRE3* у рекомбинантного штамма, имеющего бактериальный ген *xylA*, позволило значительно поднять выход этанола из ксилозы.

Вторичные метаболиты

Регуляция синтеза

Ферменты, катализирующие этапы вторичного метаболизма, гораздо менее специфичны, чем ферменты первичного метаболизма, и могут участвовать в превращениях многих структурно сходных продуктов. Поэтому путь от начального к конечному соединению не столь жестко детерминирован. Этот путь сильно разветвлен и его конечные этапы могут быть представлены скорее в виде сетки, нежели линии. В связи с этим у многих природных штаммов и видов грибов обнаружены целые семьи структурно и функционально сходных соединений. Отсутствие высокой специфичности в действии ферментов часто приводит к тому, что при генетическом блоке какого-либо шага промежуточный продукт не накапливается, а используется в боковом шунте или даже метаболизируется ферментом, нормально оперирующим на следующем этапе.

Генетические основы селекции вторичных метаболитов рассмотрим на примере антибиотиков (пенициллины, цефалоспорины).

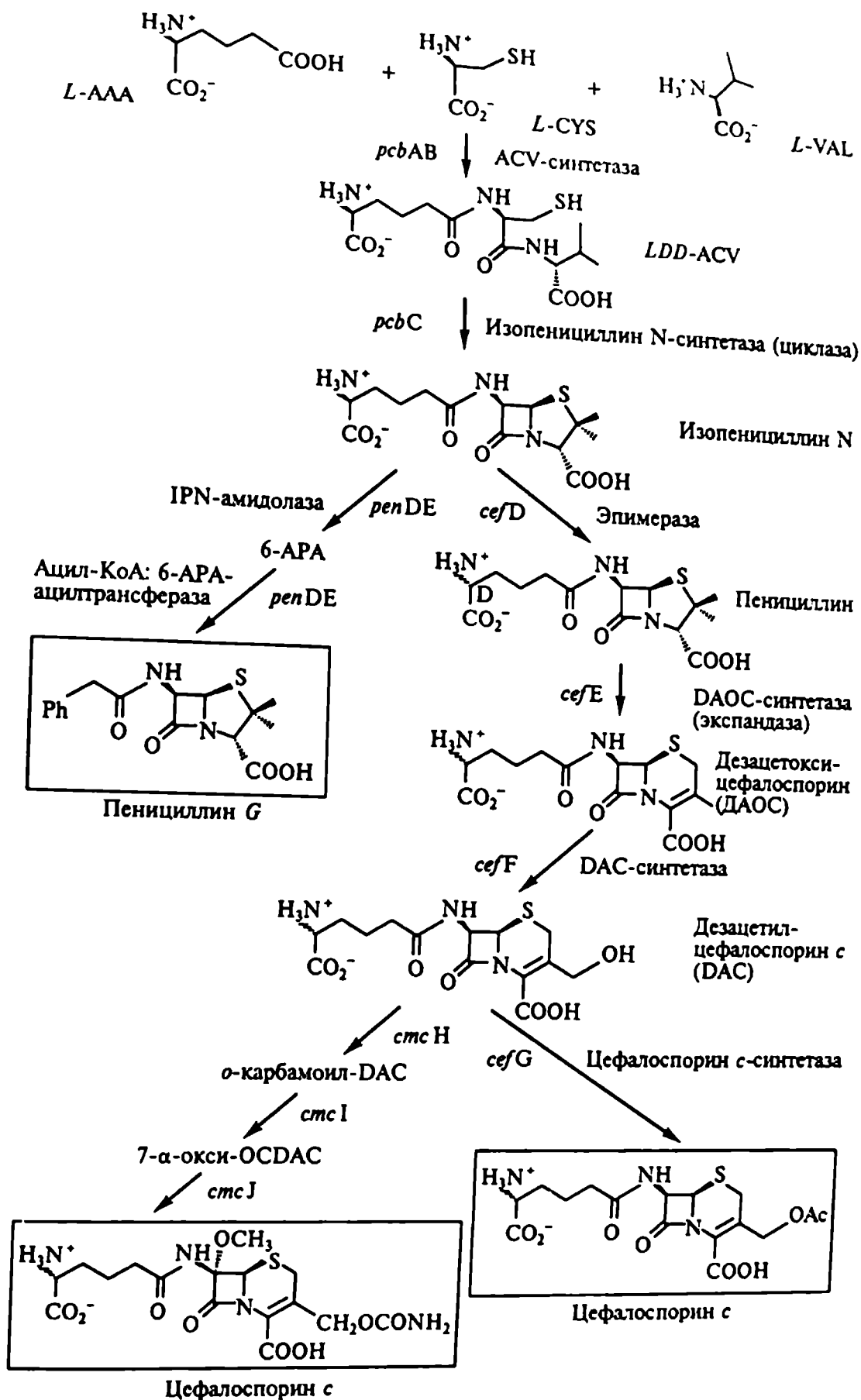
Пенициллины и цефалоспорины

Пенициллины и цефалоспорины относятся к группе β -лактамовых антибиотиков, содержащих четырехчленное амидное кольцо (β -лактам). У пенициллинов оно соединено с пятичленным триазолидиновым циклом и ациламинной боковой цепью. У цефалоспоринов четырехчленное β -лактамовое кольцо соединено с шестичленным ненасыщенным дигидротиазиновым циклом (рис. 74). Соединения, содержащие β -лактамовый цикл, встречаются у ряда грибов, а также грамположительных и грамотрицательных бактерий (рис. 75).

Изучение биосинтеза пенициллинов началось после того, как в 1947 г. Дж. Боннер обнаружил, что 2 ауксотрофа по лизину не продуцируют пенициллин. На этом основании появилось предположение, что у пенициллина и лизина имеется общий предшественник. Затем выяснили, что лизин — ингибитор синтеза

Рис. 74. Биосинтез пенициллинов и цефалоспоринов.

Рядом со стрелками указаны управляющие биосинтезом ферменты и символы контролирующих их генов. *L*-AAA — *L*-аминоадипиновая кислота; *L*-CYS — *L*-цистеин; *L*-VAL — *L*-валин; *LLD*-ACV — трипептид (*L*-аминоадипиновая кислота — *L*-цистеин — *D*-валин)



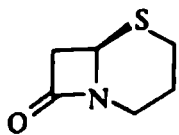
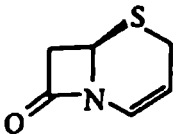
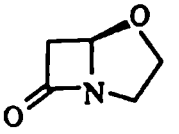
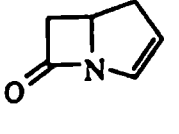
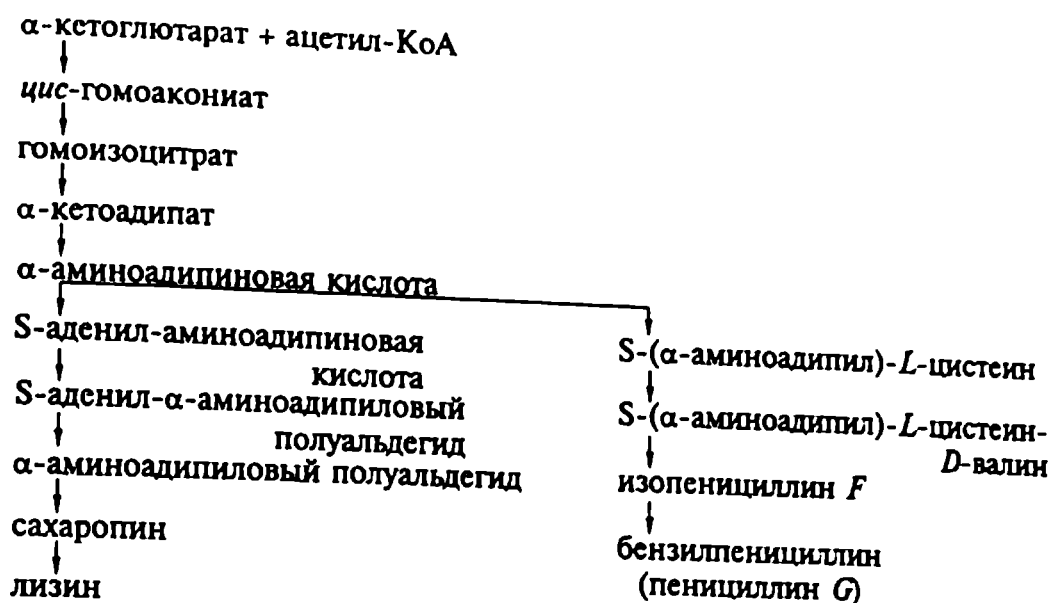
Класс β-лактама	Структура	Грибы	Бактерии	
			Грам(+)	Грам(-)
Пенам		<i>Aspergillus</i> <i>Penicillium</i> <i>Epidermophyton</i> <i>Trichophyton</i> <i>Polypaecilium</i> <i>Malbranchea</i> <i>Sartoria</i> <i>Pleurophomopsis</i>		
Цефем		<i>Cephalosporium</i> <i>Anixiopsis</i> <i>Arachnomycetes</i> <i>Spiroidium</i> <i>Scopulariopsis</i> <i>Diheterospora</i> <i>Paecilomyces</i>	<i>Streptomyces</i> <i>Nocardia</i>	<i>Flavobacterium</i> <i>Xanthomonas</i> <i>Lysobacter</i>
Клавам			<i>Streptomyces</i>	
Карбопенам			<i>Streptomyces</i>	<i>Serratia</i> <i>Erwinia</i>
Монобактам			<i>Nocardia</i>	<i>Pseudomonas</i> <i>Gluconobacter</i> <i>Chromobacter</i> <i>Agrobacter</i> <i>Acetobacter</i>

Рис. 75. Структура β-лактамовой группы у разных микроорганизмов

пенициллина в нормальных штаммах *Penicillium chrysogenum* и его не следует добавлять в среду роста. Для нейроспоры, дрожжей и *P. chrysogenum* показано, что лизин подавляет фермент, контролирующий синтез раннего продукта биосинтетического пути — гомоцитрата, гомоцитратсинтетазу (подобно тому, как ароматические аминокислоты подавляют синтез дезоксиарабиногептулезонат-7-фосфата, см. с. 224). Добавление в среду α-аминоадипиновой кислоты (другого предшественника лизина) не только восстанавливает синтез пенициллина в присутствии лизина, но резко увеличивает выход пенициллина у ауксотрофных по лизину мутантов. α-Аминоадипиновая кислота оказалась наиболее вероятным соединением, начиная с которого биосинтетический путь разветвляется на лизин и пенициллин. Об этом свидетельствует тот факт, что ауксотрофные по лизину мутанты, у которых генетический блок находится перед образованием этой кис-

лоты, не продуцируют пенициллин, а мутанты, у которых блокирован синтез лизина после нее, — продуцируют нормально. Поэтому была предложена следующая схема биосинтеза пенициллина:



Как видно из представленной схемы, во-первых, начальные пути биосинтеза пенициллина совпадают с биосинтезом лизина, и, во-вторых, в состав пенициллина включены и другие аминокислоты из числа 20 канонических — цистеин и валин. Поэтому в регуляции направленного биосинтеза пенициллина используют способы регуляции биосинтеза аминокислот, а именно: 1) не вносить лизин в питательную среду во избежание торможения начальных этапов биосинтеза конечным продуктом; 2) получить регуляторные мутации с конституционным синтезом первичных ферментов биосинтетического пути, не отзывающимся как на содержании лизина в среде, так и на его внутриклеточном содержании; 3) получить мутации структурных генов, нарушающие конечные этапы биосинтеза лизина после точки разветвления, чтобы первичные продукты были бы использованы исключительно для синтеза пенициллина, а необходимый лизин добавлять в среду; 4) получить регуляторные мутации биосинтеза цистеина и валина, не отзывающиеся на их присутствии в среде, и т.д.

Конечные (после точки разветвления) этапы биосинтеза пенициллина состоят из нескольких шагов (см. рис. 74): 1) соединение трех аминокислот — аминоадипиновой (А), цистеина (С) и валина (V) в трипептид с помощью фермента АСV-синтетазы; 2) циклизация β-лактамового кольца с помощью пенициллин-N-синтетазы (циклазы); 3) замена аминогруппы аминоадипиновой кислоты на фенил с помощью ацилтрансферазы. При биосинтезе цефалоспоринов (см. рис. 74) происходит эпимеризация

остатка аминокислотной кислоты (из *L*- в *D*-форму) и превращение пятичленного серосодержащего цикла в шестичленный.

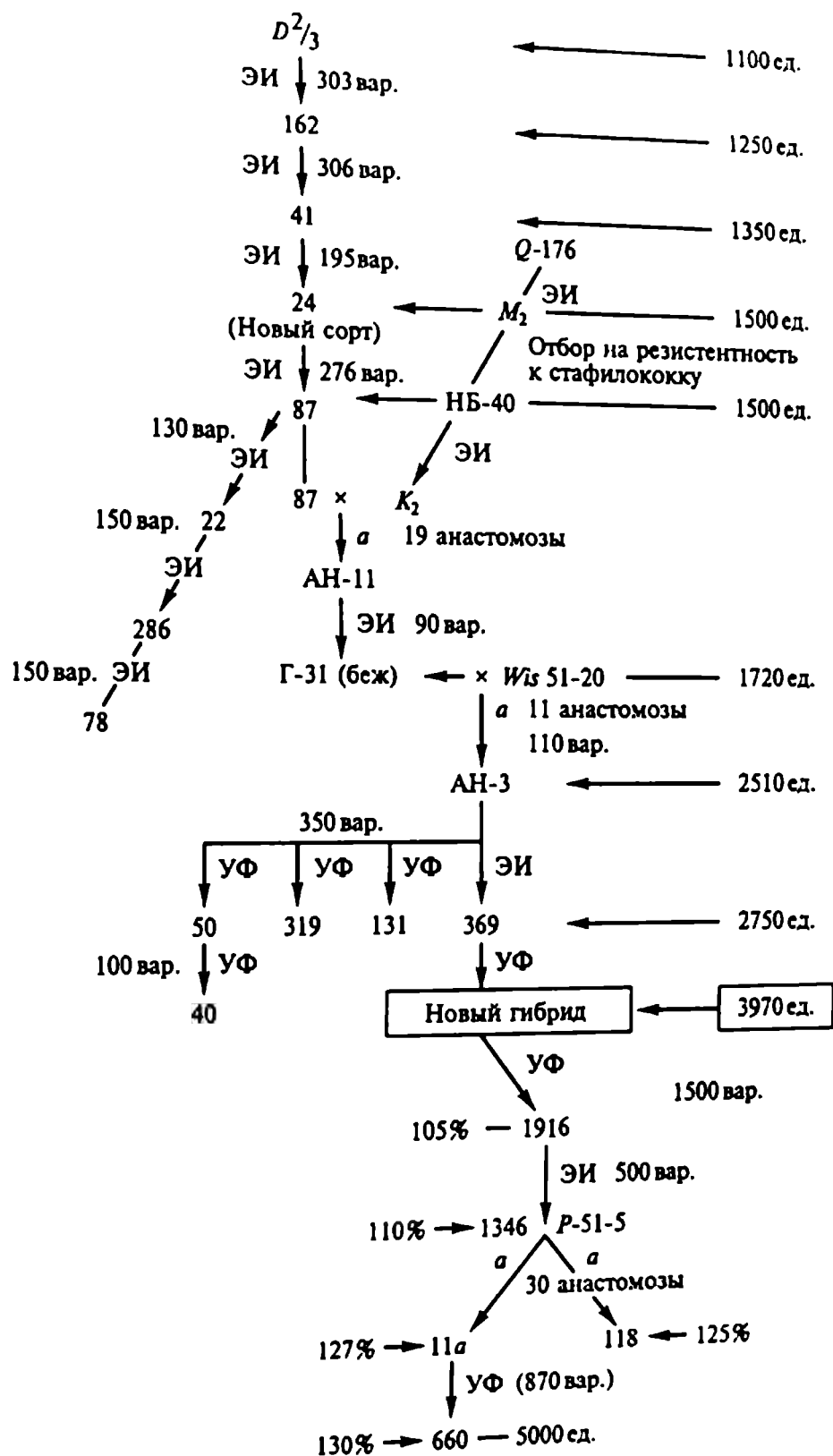
Первый фермент биосинтеза пенициллина (синтетаза) находится под контролем гена *pcbAB*, второй — *pcbC*, третий — *penDE*. Как структура этих генов (сцепление в один кластер и порядок расположения на хромосоме), так и высокая степень гомологии (гомология *pcbAB* между грибами и бактериями по аминокислотному составу белков и нуклеотидному составу генов равна около 50 %, а *pcbC* еще выше — 60—75 %) привели исследователей к парадоксальному заключению. Предполагается, что эти гены появились у грибов не при превращении прокариотной клетки в эукариотную 1,8 млрд лет назад, а гораздо позже (примерно 370 млн лет назад) вследствие горизонтального переноса участка хромосомы, несущего кластер генов. По-видимому, перенос произошел из генома грамположительных стрептомицетов, ибо эти гены у грамположительных бактерий имеют более высокий процент гомологии с грибными, чем у грамотрицательных. Эти гены у грибов в отличие от большинства других, подобно бактериальным, лишены интронов. Все продуценты β -лактамов встречаются в почве, где, возможно, и произошел горизонтальный перенос группы сцепленных генов конъюгативными плазмидами, трансформацией ДНК или вирусной трансдукцией.

Селекция

Основной метод селекции продуцентов пенициллина — ступенчатый мутагенез, при котором выделенный из природы штамм подвергается обработке мутагенными факторами, и полученные наиболее продуктивные изоляты вновь обрабатывают. При этом полезно менять мутагенные воздействия на ДНК. Для того чтобы подобный тип селекции был бы действительно успешным, необходимо в каждом цикле точно отбирать именно мутантные плюс-варианты, а не изоляты, повышенная активность которых обусловлена естественным разбросом, вызванным ненаследственной вариабельностью. Поэтому для каждого штамма полезно иметь данные о естественной изменчивости (дисперсии признака) и отбор вести за ее пределами (2σ — при заданной достоверности 95 % или 3σ — при заданной достоверности 99 %). В качестве при-

Рис. 76. Родословная высокопродуктивных штаммов *Penicillium chrysogenum* (С. И. Алиханян, 1977).

Цифры справа означают продуктивность исходного и конечного штаммов и промежуточных вариантов (в единицах активности), цифры под стрелками — число проверенных вариантов. ЭИ — обработка этиленимином; УФ — облучение ультрафиолетовым светом



мера можно привести родословные высокопродуктивных штаммов *P. chrysogenum*, полученных в 1970-х годах в СССР (рис. 76).

Опыт мутагенных обработок, проведенных в различных лабораториях, привел к следующим заключениям: 1) мутагенные обработки повышают вариацию продукции пенициллина; 2) средний урожай пенициллина снижается; 3) наибольший выход (+)-вариантов наблюдается при использовании не сублетальных, а промежуточных доз мутагена; 4) частота (-)-вариантов выше среди морфологически измененных, чем среди нормальных колоний, однако наиболее продуктивные штаммы образуют компактные колонии с слабо развитыми конидиеносцами и более мелкими кисточками; 5) ауксотрофы даже по продуктам, не связанным с основным биосинтетическим путем, могут оказать регуляторное влияние на биосинтез пенициллина вследствие предотвращения формирования или накопления интермедиатов.

Для скрининга изолятов, подвергнутых мутагенной обработке, можно использовать определение концентрации пенициллина в жидкой питательной среде после их ферментации или определение индекса продуктивности на твердой среде по диаметру лизиса чувствительных культур тест-бактерий (последний метод даст ответ в 20 раз быстрее первого и чаще используется для первичного скрининга).

Кроме высокой продуктивности любой промышленный штамм (а не только продуцент пенициллина) должен обладать и другими качествами: 1) быть генетически стабильным; 2) обильно продуцировать вегетативные клетки и споры; 3) хорошо расти и быстро накапливать инокулюм для засева промышленного ферментера; 4) утилизировать сложные органические вещества, в том числе фенилуксусную кислоту как предшественника боковой цепи; 5) не синтезировать пигменты, мешающие очистке основного продукта; 6) расти в форме компактных пеллет, легко отделяемых от среды после окончания ферментации; 7) сохранять свои свойства после длительного хранения; 8) быть отзывчивым на мутагенные воздействия.

Генетические основы селекции съедобных грибов

Высшие базидиомицеты, к которым относится большинство видов культивируемых съедобных грибов, по методологии селекционно-генетических работ имеют больше общих с высшими растениями черт, чем с микроорганизмами:

- как и пищевые растения, съедобные грибы культивируют ради пищевых продуктов, поэтому предметами селекции являются макроморфологические признаки (количество и вес плодовых тел, их форма и т.д.), в то время как большинство промышленных

микроорганизмов, включая грибы, культивируются ради биологически активных веществ, поэтому предметом их селекции являются биохимические продукты;

- культивационный цикл этих грибов растянут во времени (до нескольких месяцев), приближаясь по продолжительности к циклам некоторых высших растений;

- в жизненном цикле съедобных грибов, как и в цикле высших растений, преобладает функционально диплоидная фаза (дикариофаза), предполагающая наличие скрытого резерва изменчивости в виде рецессивных генов;

- для них (как и для высших растений) гибридизация, способная привести к объединению положительных качеств родителей и усилению урожая вследствие гетерозиса, является более важным селекционным приемом, чем мутагенез, при котором рецессивные мутации в дикарионе будут маскироваться доминантными аллелями дикого типа.

Вместе с тем способность к росту гомо- и гетерокариотичных штаммов на стандартных искусственных питательных средах в строго контролируемых условиях, использование селективных сред для отбора единичных мутантов, рекомбинантов или трансформантов из огромной популяции, небольшой геном, удобный для проведения манипуляций с рекомбинантной ДНК, — все это объединяет съедобные грибы с микроорганизмами и облегчает проведение селекционных работ с ними.

Рассмотрим генетические способы улучшения сортов съедобных грибов.

Классическая селекция преследует две задачи:

- 1) создание максимума изменчивости в изучаемой популяции;
- 2) отбор в варьирующей популяции нужных генотипов.

Оценки изменчивости

Изменчивость можно анализировать в природных популяциях организмов или искусственно увеличивать ее с помощью мутагенеза или рекомбинации.

Оценивать изменчивость можно по любым признакам — от хозяйственно-ценных, ради которых проводится селекция, до молекулярных, которые указывают на степень неоднородности популяции, но могут быть не связаны с коммерчески важными ее признаками. Наиболее точно на степень неоднородности популяции указывает полиморфизм фрагментов ДНК выбранных штаммов, ибо этот признак связан исключительно с неоднородностью генома и практически не подвержен вариациям, обусловленным эпигенетическими факторами. Для оценки степени вариабельности популяций широко используется белковый полимор-

физм. ибо белки — непосредственные продукты генов, отстоящие от них всего на один метаболический шаг. Однако экспрессия тех или иных генов и, следовательно, наличие или отсутствие соответствующих им белков, может меняться в зависимости от фазы жизненного цикла, а иногда и от условий роста организма. Хозяйственно важные признаки, такие как число и вес плодовых тел, их форма, окраска, сроки наступления волн плодоношения и т. п., удалены от кодирующих генов на много метаболических шагов, и, поскольку возможно влияние условий жизни на метаболическую экспрессию каждого шага, не исключена ошибка, при которой за генетическую изменчивость будет принята морфологическая вариабельность, обусловленная особенностями роста организма. Возникает серьезное противоречие: показатели, надежно фиксирующие генетическую вариабельность популяции, не связаны с практически важными признаками, а последние не надежно фиксируют генетическую изменчивость. Поэтому при изучении изменчивости признаков, ради которых проводится селекция, необходимо оценить степень вклада в нее генотипа методами математической генетики.

Вариация любого признака организма зависит как от его генотипа, так и от условий его жизни. Эта двойная зависимость описывается уравнением

$$V_p = V_g + V_e,$$

где V_p — фенотипическая варианса; V_g — генотипическая варианса; V_e — варианса, обусловленная внешней средой (экологическая варианса). Вклад экологической вариансы устанавливают по поведению одного генотипа в разных условиях жизни. Генотипическая варианса более сложна, ибо часто контролируется несколькими генами, которые к тому же могут взаимодействовать друг с другом. Допустим, на проявление какого-либо признака оказывает влияние локус A с двумя аллелями — A_1 и A_2 , причем гомозигота A_1A_1 обеспечивает наибольшее количественное выражение признака, а A_2A_2 — наименьшее:

Генетическую вариансу, обусловленную гомозиготой A_1A_1 , обозначим как $y_{11} = m + a$, вариансу гомозиготы A_2A_2 — как $y_{22} = m - a$, а вариансу гетерозиготы — $y_{12} = m + d$, где m — среднее из двух гомозигот; a — $1/2$ различий между гомозиготами, d — отклонение гетерозиготы от средней между гомозиготами. Часто на проявление признака оказывают влияние не один, а несколько генов (B , C и др.). Поэтому подобные же процедуры можно сделать и с ними.

Если между аллелями A_1 и A_2 , B_1 и B_2 и т. д. нет взаимодействия, то $d = 0$; $y_{12} = 1/2(y_{11} + y_{22}) = m$. В этом случае общая генетическая варианса обусловлена лишь числом локусов, определяющих данный признак, и называется невзаимодействующей, или

аддитивной (A). Часто, однако, наряду с числом генов на проявление признака оказывает влияние и их взаимодействие. Взаимодействие аллельных генов называют *доминантностью* (D). Она указывает на отклонение показателя гетерозигот от среднего между гомозиготами и имеет величину d (при $d = a$ наблюдается полная доминантность аллеля A1 над A2). Кроме взаимодействия аллельных генов возможно *неаллельное* взаимодействие, или *эпистаз* (I), при котором одни гены влияют на проявление признака, контролируемого другими, часто несцепленными с ними генами.

Таким образом, общая генетическая вариация описывается уравнением

$$V_g = V_a + V_d + V_i,$$

а общая фенотипическая

$$V_p = V_a + V_d + V_i + V_e.$$

Отношение генетической вариации к общей фенотипической называется *коэффициентом наследуемости*:

$$H^2 = V_g / V_g + V_e.$$

Как видно, чем выше вклад генетической вариации в общую изменчивость признака, тем эффективнее отбор генетически измененных вариантов в популяции.

Чтобы оценить вклад генотипа и среды в изменение интересующего селекционера признака, не обязательно проводить скрещивания. Достаточно сравнить вариацию признака у генетически однородной линии грибов (например, моноспорового штамма) с другими генетически однородными линиями. Если различия между повторностями одного штамма меньше, чем между штаммами, то генетическая компонента дает вклад в вариацию признака. Для полной рендомизации опыта отдельные повторности лучше разделить на несколько блоков (например, для изучения скорости роста колоний на агаре каждую чашку Петри инокулировать тремя повторностями и сделать 2—3 чашки — блока). Тогда полный опыт будет иметь следующий вид (табл. 29).

На основании полученных данных проводится двухфакторный дисперсионный анализ (первый фактор — штаммы, второй — блоки).

После этих предварительных замечаний рассмотрим эффективность различных приемов отбора в целях генетического улучшения штаммов съедобных грибов.

Вычисление вариаций проводится, как показано в табл. 30.

Достоверные отличия вариаций от нуля оценивают по критерию Фишера для соответствующего числа степеней свободы.

Например, в опытах Дж. Джинкса (C. Caten, J. Jinks, 1968) изучали линейную скорость роста 100 штаммов *Schizophyllum commune*

Таблица 29. Схема записей результатов опыта по оценке вклада генетической вариации в проявление количественного признака

генетический вариант								
Штаммы	Блоки (чашки Петри) и повторности (колонии)						Сумма	Среднее
	A1			A2				
	1	2	3	1	2	3		
B1								
B2								
B3								
Вн								
Сумма								
Среднее								

Таблица 30. Значения показателей генотипической и средовой вариации по результатам дисперсионного анализа

Градации	Степени свободы	Вариансы
Между штаммами	$S - 1$	$\sigma^2 e + p\sigma^2 g$
Между блоками	$p - 1$	$\sigma^2 e + \sigma^2 p$
(Штаммы) $\times$ (блоки)	$(S - 1) \times (p - 1)$	$\sigma^2 e$
Общая вариация	$Sp - 2$	

Примечание. S — число штаммов; p — число блоков; $\sigma^2 e$ — вариация, обусловленная влиянием внешней среды; $\sigma^2 g$ — генетическая вариация; $\sigma^2 p$ — вариация между повторностями.

в двух рендомизованных блоках. Были получены следующие данные (табл. 31).

Как видно, различия между штаммами значительно больше, чем между блоками, следовательно, генетическая вариация имеет высокий показатель. Вариация, обусловленная внешней средой, $\sigma^2 e = 5,72$ (табл. 31), а генетическая вариация $\sigma^2 g = 1/2(85,60 - 5,72) = 39,94$.

Таблица 31. Результаты дисперсионного анализа скорости роста штаммов *S. commune* (С. Е. Caten, J. Jinks, 1968)

Градации	Степени свободы	Вариансы
Между штаммами (P)	99	85,60
Между блоками (B)	1	5,82
P $\times$ B	198	5,72

Таблица 32. Коэффициенты наследуемости и вариации признаков шампиньона (И. Н. Рыбакова и др., 1991)

Признак	H^2	CV
Урожайность	0,53	67,46
Число плодовых тел	0,80	87,31
Средняя масса плодового тела	0,66	20,06
Средняя масса шляпки	0,86	22,40
Средний диаметр шляпки	0,71	6,99
Средняя высота шляпки	0,60	3,10
Скорость роста мицелия:		
на пшеничном агаре	0,71	73,12
на компостном агаре	0,73	34,78

Примечание. H^2 — коэффициент наследования; CV — коэффициент вариации.

Таким образом, суммарный вклад генотипа и среды в вариацию скорости роста (100 %) = $39,94 + 5,72 = 45,76$; $Vg = 39,94 \times 100 / 45,76 = 87,3$ %; $Ve = 12,7$ %.

В табл. 32 в качестве примера приведены данные по изучению наследуемости и вариабельности некоторых количественных признаков у 32 сортов шампиньона из коллекции совхоза «Зарежье».

Все исследованные признаки шампиньона имеют высокие коэффициенты наследуемости, причем самый низкий показатель (0,53) имеет наиболее важный признак — урожайность. Это можно объяснить тем, что признак «урожайность» искусственный, складывающийся путем перемножения двух других признаков — «число плодовых тел» и «средняя масса плодового тела». Для того чтобы отбор был эффективным, необходимы не только высокая доля наследственной вариации, но и высокий уровень самой вариации, ибо при ее отсутствии не из чего выбирать. Как видно из данных табл. 32, слабо варьируют мерные признаки (диаметр и высота шляпки), в то время как число плодовых тел оказалось чрезвычайно варьирующим. Высокая степень вариации этого признака сопровождается высокой долей генетической вариации. Поскольку число плодовых тел положительно коррелирует с урожайностью (коэффициент корреляции между этими показателями в проведенных опытах составил 0,81), этот признак, по-видимому, является центральным при отборе сортов на продуктивность.

После этих предварительных замечаний рассмотрим эффективность различных приемов отбора продуктивных штаммов съедобных грибов в варьирующей популяции.

Использование природной изменчивости

В отличие от высших сельскохозяйственных растений, которые имеют тысячелетнюю историю народной селекции и более сотни лет научной генетики и селекции, грибы недавно введены в культуру, и только культивирование сиитаке в Восточной Азии и шампиньона в Европе насчитывает несколько столетий. Лишь с несколькими видами в последние десятилетия начата интенсивная селекционная работа. Поэтому потенциал природной изменчивости съедобных грибов огромен, и дикорастущие штаммы продолжают оставаться богатейшим резервом для улучшения коммерческих сортов. Так, выделенный Л. В. Гарибовой из природы штамм шампиньона N273 вследствие удовлетворительной урожайности и высокой экологической пластичности (способности сохранять урожайность даже в плохих условиях культивирования) долгое время выращивался во многих хозяйствах бывшего СССР. В 1928 г. в одной из голландских теплиц был обнаружен сросток шампиньонов белой окраски (природные штаммы шампиньона имеют коричневые или бежевые плодовые тела), возникший, по-видимому, в результате спонтанной мутации. Этот сросток дал начало серии европейских белых сортов. Обнаруженные во Флориде (США) дикорастущие штаммы вешенки плодоносят при повышенной температуре (большинство европейских и азиатских штаммов этого гриба требуют для перехода от вегетативного роста к плодоношению резкого снижения температуры — «температурного шока», что значительно удорожает производственный процесс). Флоридские штаммы дали начало большому числу «бесшоковых» сортов.

Однако эффективность эксплуатации природной изменчивости по мере улучшения качества культивируемых сортов и условий культивирования снижается. Природные штаммы не выдерживают конкуренции с современными селекционными сортами.

Мутагенез

Мутагенез — универсальный прием увеличения генетической изменчивости, полезный не только для улучшения хозяйственно-ценных признаков, но и для получения маркерных признаков, необходимых для контролируемой гибридизации, слияния протопластов, манипуляций с ДНК и пр. Иногда эти задачи удается совместить. Например, в лаборатории английского генетика Т. Эллиота были получены мутанты *Agaricus bisporus*, резистентные к фунгициду беномилу. Беномил используется для борьбы с паразитом шампиньона грибом *Verticillium fungicola*, поэтому резистентные к беномилу штаммы шампиньона позволяют более эффективно бороться с болезнью. Вместе с тем моногенная ре-

зистентность к беномилу — хороший маркер для отбора гибридов на среде с фунгицидом.

Культивируемый шампиньон имеет уникальный жизненный цикл — псевдогомоталлизм (см. с. 203), поэтому изменения, полученные при мутагенной обработке спор, сохраняются и в плодовых телах. Однако поскольку споры шампиньона многоядерные, отбирать можно только доминантные или полудоминантные мутации, ибо рецессивные мутации будут маскироваться аллелями дикого типа в гетерокарионе. У большинства других съедобных грибов вследствие одноядерности спор можно выделять и рецессивные мутации, но их влияние на фенотип плодовых тел можно будет оценить только после скрещиваний.

С помощью мутагенеза можно решать ряд проблем, связанных с модификацией отдельных генов, например создание бесшоковых и аспорогенных сортов вешенки (споры вешенки — сильные аллергены), устойчивых к болезням и вредителям сортов шампиньона и т. п.

Рекомбинация

Рекомбинация имеет гораздо больше возможностей, чем мутагенез, так как позволяет подбирать необходимые изменения, а не искать их среди случайно возникших. Эффективность рекомбинации зависит от ее типа (табл. 33).

Таблица 33. Механизмы и способы генетической рекомбинации у высших базидиальных грибов (K. Esser, F. Meinhardt, 1986, с добавлениями)

Механизм	Способы	Возможности
Половая гибридизация (рекомбинация при мейозе)	Скрещивание гаплоидных мицелиев, гетероаллельных по локусам	Соединение хозяйственно-ценных признаков двух сортов, увеличение урожайности вследствие гетерозиса
Вегетативная (парасексуальная) рекомбинация при митозе	Слияние протопластов или дикариотических мицелиев	Передача сорту полезных признаков из родственных видов грибов, разделенных барьером половой несовместимости; получение гибридов у автофертильных видов
Генетическая трансформация	Клонирование генов и введение их в геном с помощью векторов	Введение желательных генов из любых организмов, независимо от их филогенетического родства с реципиентом. Улучшение сорта по моногенно контролируемым признакам

Половая гибридизация

Большинство съедобных грибов имеет половое размножение в жизненном цикле. Их споры самостерильны, поэтому для формирования плодового тела необходимо скрещивание изолятов, гетероаллельных по одному (при биполярном типе несовместимости) или двум (при тетраполярном типе) факторам спаривания. Дикариотические мицелии многих грибов отличаются от гомокариотических по морфологии (фактуре мицелия, скорости роста) или цитологии (наличию пряжек), поэтому наличие гибридов можно установить и без использования генетических маркеров. У наиболее широко культивируемого гриба шампиньона двуспорового споры в массе исходно гетероаллельны по локусу спаривания и, следовательно, автофертильны. Поэтому для гибридизации культивируемого шампиньона предварительно выделяют редкие гомокариотические споры, которые формируют медленно растущие колонии. Долю таких спор в популяции можно значительно повысить предварительным центрифугированием в градиенте плотности сахарозы. Можно также выделять одноядерные вегетативные клетки протопластированием мицелия.

Гибридизация сельскохозяйственных растений имеет длительную историю и хорошо разработанную теоретическую основу. Разработана генетическая теория подбора родителей на основе их общей и специфической комбинационной способности, т.е. способности передавать свои признаки потомству. Как сказано выше, генетическая вариация складывается из невзаимодействующей (аддитивность) и взаимодействующей (доминантность, эпистаз) компонент. Сумму аддитивных эффектов всех генов [a] называют *селекционной ценностью сорта*, она является основой для определения *общей комбинационной способности* сорта, т.е. его способности передавать свои высокие качества гибридам. Сочетание доминантных и аддитивных вариантов определяет *специфическую комбинационную способность* (табл. 34). Применительно к базидиальным грибам *Schizophyllum commune*, *Flammulina velutipes* подходы к анализу комбинационной способности штаммов разрабатывались в лаборатории Дж. Джинкса в Бирмингемском университете (Великобритания).

Из плодового тела было выделено по 6 моноспоровых изолятов каждого типа спаривания (A1B1, A2B2, A1B2 и A2B1) и проведены попарные скрещивания совместимых штаммов (36 кроссов первой группы — A1B1 × A2B2 и 36 кроссов второй группы — A1B2 × A2B1). Исследовали интересные признаки (скорость роста мицелия, время начала плодоношения, урожайность и т.п.) у исходного дикариона, 24 монокарионов и 72 дикарионов F1.

Таблица 34. Схема расчета **варианс**

Градации	Степень свободы	Вариансы
(1) Между кроссами	$(f \times m) - 1$	$\sigma_E^2 + n\sigma_G^2$
(2) Между блоками	$n - 1$	$\sigma_E^2 + (f \times m)\sigma_B^2$
(3) Блоки $\times$ кроссы	$[(f \times m) - 1] \times (n - 1)$	σ_E^2
Деление 1-й градации:		
(4) Между «отцами»	$f - 1$	$\sigma_E^2 + n\sigma_1^2 + nm\sigma_{P1}^2$
(5) Между «матерями»	$m - 1$	$\sigma_E^2 + n\sigma_1^2 + nf\sigma_{P2}^2$
(6) «отцы» $\times$ «матери»	$(f - 1) \times (m - 1)$	$\sigma_E^2 + n\sigma_1^2$

Примечание. f — «отцы» — монокарioni одного типа спаривания; m — «матери» — монокарioni противоположного типа спаривания; n — повторности (блоки); σ_E^2 — экологическая вариация; σ_1^2 — неаддитивная генетическая вариация (с коэффициентом n , так как получена от суммирования величин, основанных на n наблюдениях); σ_{P1}^2 и σ_{P2}^2 — аддитивные генетические компоненты родителей, помноженные на число наблюдений ($n \times f$ и $n \times m$); σ_G^2 — общая генетическая компонента вариации; σ_B^2 — вариация повторностей (блоков).

Вычисления компонент проводят следующим образом:

$$\sigma_E^2 = (3); \sigma_1^2 = [(6) - (3)]/n;$$

$$\sigma_{P1}^2 = [(4) - (6)]/nm; \sigma_{P2}^2 = [(5) - (6)]/nf.$$

Общая аддитивная вариация равна сумме двух родительских вариантов.

Приведенная выше информация полезна для подбора родительских пар. Необходимо, чтобы они имели, во-первых, высокую генетическую вариацию по признаку, который подвергается отбору, во-вторых, высокий аддитивный ее компонент и, в-третьих, различия по многим аддитивным генам. При наличии этих генетических особенностей возможен эффективный отбор потомства в скрещивающихся популяциях. По мере того, как все большее число благоприятных комбинаций генов будет попадать в отбираемую линию, эффективность отбора будет падать. Этот процесс одновременно будет сопровождаться снижением у них генетической вариации. Следовательно, все гены, обеспечивающие наследование отбираемого признака, перешли в гомозиготное состояние.

Отсюда еще одно важное для селекции понятие — *селекционный лимит сорта*, представляющий собой максимальное среднее популяции, достигаемое длительным отбором. Время, требуемое для достижения селекционного лимита, зависит от числа расщепляющихся в потомстве генов. Чем их больше, тем дольше время (число генераций), необходимое для достижения лимита, т.е. тем эффективнее отбор. При 10 аддитивных генах в отсутствие взаи-

действующей варiances один цикл отбора снижает расстояние до селекционного лимита на 0,22, а при 100 генах — на 0,07. Для повышения эффективности отбора у штаммов, приблизившихся к селекционному лимиту, необходимо привлекать для скрещивания новые штаммы, имеющие иные аддитивные гены.

Имея описанные выше данные, можно определить минимальное число эффективных факторов, влияющих на количественные признаки, — *quantitative trait loci* (QTL). Этими факторами могут быть отдельные гены или их блоки.

Число QTL (k) = $1/4 (\bar{P}1 - \bar{P}2)/\sigma_G^2$ или, более точно, $k = 1/4$ (гра-
дация $\bar{F}1$) $^{-1/4}$.

Использование молекулярных маркеров в селекции

Выделение гомакариотических штаммов. Ранее говорилось о том, что культивируемый шампиньон вследствие псевдогомакариотического цикла имеет автофертильные споры, поэтому для проведения скрещиваний необходимо выделение гомакариотических спор. В связи с тем что ни один морфологический или цитологический признак не позволяет однозначно отделить гомакариотические колонии от гетерокариотических, для этой цели удобно использовать молекулярные маркеры.

Изоферменты, аллели которых кодоминантны, могут быть использованы для дискриминации гетерокарионов, дающих больше, чем у гомакарионов, полос на электрофоретическом геле вследствие наличия гетерозиготных локусов. Для этих целей удобно использовать многолокусные ферменты, такие, как эстеразы (рис. 77).

RFLP-полиморфизмы ДНК, как и изоферменты, образуют кодоминантные локусы, но большее число маркеров делает этот метод более информативным, чем предыдущий. С помощью RFLP удалось построить физическую карту и карту сцепления генов шампиньона. Этот метод использован и для патентной защиты селекционных штаммов.

RAPD-полиморфизмы обеспечивают исследователя практически неограниченным числом маркеров. Однако метод требует высокоочищенного препарата ДНК и имеет тот недостаток, что показывает наличие только доминантных локусов (рецессивные аллели представлены отсутствием полосы, и их трудно отличить от аллелей, неамплифицированных в ПЦР). Используется также для выделения гомакариотических штаммов и для паспортизации сортов.

SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions) наиболее широко используется при изучении генетики шампиньона. С помощью специальной программы подбирают пару ПЦР-праймеров

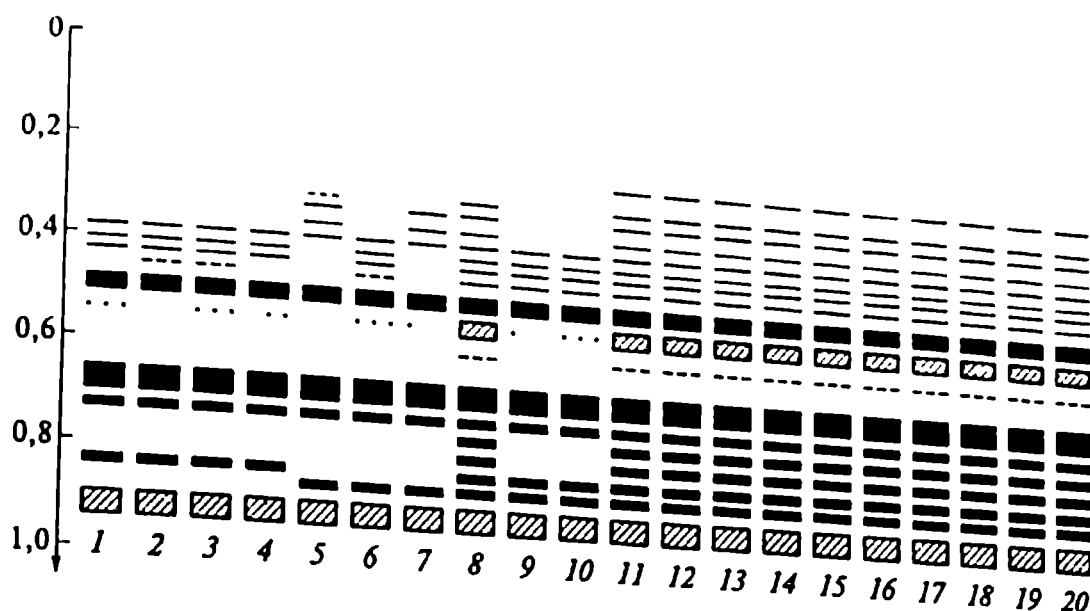


Рис. 77. Электрофоретические спектры изоферментов α - и β -эстераз *Agaricus bisporus* (О. В. Камзолкина и др., 1992).
 1—10 — медленно растущие (предположительно гомокариотические) моноспоровые потомки; 11 — родительский сорт U-3 (тканевая культура); 12—20 — быстро растущие моноспоровые потомки (гетерокариотические). Культура 8 оказалась гетерокариотической

и амплифицируют полосы известных размеров и последовательностей. SCAR-маркеры обычно доминантны, не требуют высокой очистки ДНК.

Селекция гибридов. Использование молекулярных маркеров позволяет селекционеру отобрать в потомстве от гибридизации isolates, несущие желаемый ген по сцепленному с ним маркерному гену. Так, показано, что у культивируемого шампиньона локусы, контролирующие тип спаривания и число спор на базидии на хромосоме I тесно сцеплены с RFLP-локусом *pln150* и изоферментными локусами *PER1* и *PER2*; локус, определяющий цвет шляпки, сцеплен с изоферментным локусом *ADH* и SCAR-маркером L-43. У вешенки *Pleurotus ostreatus* аллели локусов спаривания *A* и *B* сцеплены с генами, влияющими на скорость роста гомокариотического мицелия. Монокарионы, имеющие аллель *A2*, росли быстрее, чем монокарионы с аллелью *A1*, а монокарионы с *Ba1* росли быстрее монокарионов с *Ba2*. Это позволяет конструировать ди-карионы, которыми быстро зарастает субстрат.

Картирование QTL. С развитием методов анализа ДНК появилась возможность картировать локусы, влияющие на количественные признаки (QTL), с помощью комбинации молекулярных и фенотипически проявляющихся. Для этого скрещивают штаммы, различающиеся по изучаемому количественному признаку (например, скорости роста или урожайности) и изучают расщепление в потомстве по этому признаку параллельно с расщеплением

ем по большому числу молекулярных маркеров (RAPD, RFLP, SCAR). Анализ сцепления позволяет локализовать QTL на рестрикционной карте. Например, устойчивость шампиньона к бактериальной пятнистости (возбудитель *Pseudomonas tolaasii*) контролируется полигенно. Один из QTL сцеплен с геном, влияющим на цвет шляпки.

Гетерозис

Еще один фактор, который надо учитывать при подборе скрещивающихся родительских штаммов, — эффект гетерозиса, т.е. превышение численного показателя селективируемого признака у потомков по сравнению с родителями. Показатель гетерозиса определяют по уравнению

$$\text{гетерозис (\%)} = \{[(F1 - (P1 + P2)/2)/(P1 + P2)/2] \times 100\},$$

где P1 и P2 — показатели признака у родителей; F1 — показатель признака у гибридного потомства.

Вегетативная гибридизация

У культивируемого шампиньона показано наличие парасексуальной рекомбинации, вследствие которой можно получить рекомбинанты по RFLP-локусам при слиянии гиф гомо-гетеро- и гетеро-гетерокарионов. Однако больше исследований посвящено соматической рекомбинации, получаемой при слиянии не гиф, а протопластов, ибо при этом можно получать гибриды не только между штаммами одного вида, но и между видами грибов. Например, с помощью слияния протопластов получены гибриды между разными видами вешенок *Pleurotus ostreatus* и *P. cornucopiae* var. *citrinopileatus*, *P. ostreatus* и *P. salmoneo-stramineus* и др. Гибридный характер регенерантов определяли по изоферментным и RFLP-локусам. Этот метод дает большие возможности для проведения гибридизации между видами, разделенными барьером интестерильности.

Генетическая инженерия

Скорость зарастания субстрата, полнота его утилизации и, в конечном счете, урожай зависят от активности ферментов, секретируемых культивируемыми грибами во внешнюю среду. Съедобные культивируемые грибы способны продуцировать большое число экстрацеллюлярных гидролитических и окислительных ферментов, включая лакказы, эндо- и экзоцеллюлазы, целлобиазы,

протеазы, глюкозоамидазы, мурамидазы, ксиланазы, липазы и нуклеазы. Биодеструкционная активность базидиальных грибов в природных биоценозах обеспечивается в основном комплексом целлюлолитических и лигнолитических ферментов; гены многих из них у таких коммерчески важных видов, как *Agaricus bisporus*, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaeta chrysosporium*, не только охарактеризованы, но и клонированы, а их последовательности секвенированы. Показано, что секрция многих ферментов обеспечивается не единичными генами, а семействами (два и более гена), дифференцированно экспрессируемыми на разных стадиях развития гриба. Кроме того, секрция многих ферментов не является конститутивной, а индуцируется под действием тех или иных веществ в среде (добавок, субстратов), например глюкозы, азотсодержащих веществ и т.д. Например, целлюлолитическая активность у шампиньона наблюдается во время каждой «волны» плодотворения.

Можно отметить три основных подхода к повышению грибами секрции ферментов: 1) оптимизация условий культивирования; 2) селекция штаммов, в том числе с применением мутагенеза; 3) клонирование генов и достижение максимального уровня секрции с помощью рекомбинантных ДНК-технологий.

Современная молекулярная генетика позволяет проводить быструю идентификацию наличия в среде тех или иных секретиремых ферментов (по наличию пула мРНК) на разных стадиях жизненного цикла гриба и «находить» соответствующий им ген в библиотеке клонов тотальной ДНК данного организма (с помощью гибридизации). Обладая данной информацией, можно продвигаться дальше в направлении повышения активности данного гена, применяя методы генной инженерии, такие, как направленный мутагенез (site-directed mutagenesis), способный изменить активный центр белковой молекулы в направлении «суперсекреции» данного фермента, или «переносить» желаемые гены и получать трансгенные штаммы-продуценты.

Многие селекционные центры за рубежом инвестируют немалые средства в развитие современных подходов, основанных на молекулярных ДНК-технологиях. Можно отметить успешное развитие эффективной системы трансформации для съедобных грибов — шампиньона и вешенки. Система трансформации шампиньона основана на отборке трансформантов с помощью гена устойчивости к гиромоцину В (*hpr*-ген) кишечной палочки. Трансформацию (или введение донорной ДНК в клетку реципиента) можно проводить как методами электропорации («впрыскиванием» рекомбинантной ДНК в протопласты гриба), «бомбардированием» («баллистическое впрыскивание» микроскопических частичек золота, покрытых донорной ДНК), так и через пилли *Agrobacterium tumefaciens*.

Для проведения успешной работы по улучшению сортов нужно иметь четкие цели, ради которых можно проводить воздействие на процессы, регулирующие рост, развитие, старение и урожайность грибов. Эти важные процессы можно охарактеризовать, имея представление о генах, регулирующих их протекание. К настоящему времени изолированы и охарактеризованы многие гены и кДНК. Так, для шампиньонов охарактеризованы три целлюлазных гена — *CEL1*, *CEL2*, *CEL3*, дифференцированно индуцируемых целлюлозой, два лакказных гена *LCC1*, *LCC2*, регуляция экспрессии которых осуществляется по-разному при наличии в среде деградированных мРНК этих генов.

ГЕНЕТИКА ПАТОГЕННОСТИ ФИТОПАТОГЕННЫХ ГРИБОВ

Среди возбудителей болезней растений фитопатогенные грибы вызывают наиболее разнообразные и вредоносные заболевания. Огромная численность их популяций и высокая изменчивость приводят к тому, что созданные селекционерами устойчивые сорта вскоре после начала коммерческого выращивания начинают поражаться новыми расами, а синтезированные химиками новые фунгициды вскоре теряют свою эффективность вследствие накопления резистентных к ним штаммов. Поэтому исследование генетики фитопатогенных грибов имеет большое практическое значение.

Важнейшее свойство фитопаразитов — их патогенность.

Патогенность — это способность вызывать повреждения у зараженного растения. В широком смысле патогенность рассматривается как комплекс признаков, отличающих паразитов от непаразитов. Однако паразиты отличаются от сапрофитов большим числом признаков (и, следовательно, генов) — морфологических, физиологических, биохимических. Для изучения сложного понятия *патогенность* его можно разделить на качественную и количественную составляющие.

Качественная составляющая патогенности — *вирулентность* — представляет собой способность данного генетически однородного штамма паразита развиваться за счет генетически однородного образца растения-хозяина. По вирулентности виды фитопатогенных грибов дифференцируют на специализированные формы и расы. Специализированной формой (*formaе speciales*) называют группу штаммов какого-либо вида гриба, которые, имея перекрывающиеся морфологические признаки с другими группами штаммов того же вида, отличаются от них способностью поражать определенный вид (или несколько родственных видов) растения-хозяина. Физиологической расой, расой по хозяину, или *патотипом*, называют группу штаммов, вирулентных к образцам растений, имеющих одинаковые гены устойчивости. В связи с качественным характером вирулентности нельзя говорить о более высоком или низком ее уровне, но можно характеризовать расы с более или менее широкой вирулентностью, подразумевая под этим число генетически разнородных образцов растений, поражаемых сравниваемыми расами.

Таблица 35. Пораженность образцов растений штаммами паразита (баллы)

Штамм паразита	Сорт растений		
	А	Б	С
<i>a</i>	1	2	1
<i>b</i>	0	0	4
<i>c</i>	4	4	4

Примечание. 0 — отсутствие пораженности; 4 — максимальная пораженность.

Агрессивность — количественный компонент патогенности. Под агрессивностью понимают степень патогенности расы, т.е. способность вызвать массовое поражение восприимчивых растений — *эпифитотию*. В понятие агрессивности входят такие показатели, как минимальная инфекционная нагрузка, продолжительность латентного периода (от заражения до образования потомства), обуславливающая образование нескольких после-

довательных генераций в течение одного сезона (полициклическое развитие), обильное образование потомства.

Таким образом, в отличие от вирулентности можно говорить о большей или меньшей агрессивности.

Соотношение агрессивности и вирулентности показано на схеме (табл. 35).

Штамм *a* имеет широкую вирулентность (поражает все три сорта), но низкую агрессивность; штамм *b* — высокую агрессивность, но узкую вирулентность; штамм *c* — широкую вирулентность и высокую агрессивность.

Таким образом, штаммы, авирулентные к данному сорту, для него не агрессивны, а вирулентные для него штаммы могут иметь разную степень агрессивности.

Генетика патогенности

Вирулентность

На основании вирулентности фитопатогенные грибы разделяют на физиологические расы или расы по хозяевам. Обычно для выделения и идентификации рас генетически однородными изолятами из популяции заражают растения-дифференциаторы. Методы дифференциации рас описаны во многих руководствах по фитопатологии. Здесь отметим лишь методы изучения генетики вирулентности.

Большое значение для изучения генетической природы вирулентности сыграли исследования ржавчинных грибов. Методы гибридологического анализа возбудителя стеблевой ржавчины *Puccinia graminis* разработали в 40-годах XX в. канадские фитопатологи М. Ньютон и Т. Джонсон. Половой процесс у этого гриба протекает на листьях барбариса, где гаплоидные *спермации* оплодотво-

Таблица 36. Вирулентность двух рас и их гибридов
P. graminis f. *sp. tritici* к некоторым сортам пшеницы
 (M. Johnson, T. Newton, 1946)

Раса	Тип инфекции на сортах		
	<i>Канред</i>	<i>Арнаутка</i>	<i>Вернал</i>
9	0	4	4
36	4	1	0
9 × 36	0	4	0

ряют гаплоидные гифы спермогониев. Образующиеся вследствие оплодотворения двухъядерные (дикариотические) эциоспоры заражают пшеницу, на стеблях которой летом образуются урединоспоры, чьи ростки способны снова заражать пшеницу. К осени в зараженных стеблях формируются покоящиеся телиоспоры, где после зимовки происходят кариогамия и мейоз и формируются тетрады гаплоидных базидиоспор, осуществляющих первичное заражение барбариса. Спермации из возникших на зараженных листьях барбариса спермогониев переносят стерильной платиновой иглой в другие спермогонии. Если оплодотворяют спермогонии, возникшие в результате заражения базидиоспорами той же расы, то проводят инбридинг, если же переносят спермации в спермогонии, возникшие после заражения другой расой, — проводят гибридизацию. Поскольку *P. graminis* гетероталличен и вероятность оплодотворения равна 50 %, примерно половина оплодотворенных спермогониев сформирует на нижней стороне листа эции. Эциоспоры переносят на проростки пшеницы, не имеющей эффективных генов устойчивости, чтобы не потерять среди гибридных спор слабовирулентные сегреганты. Образующимися урединоспорами заражают сорта пшеницы, контрастные по устойчивости к родительским штаммам ржавчины, и по реакции на заражение судят о доминантности или рецессивности генов вирулентности (табл. 36).

Как видно из таблицы, вирулентность расы 9 для сорта *Арнаутка* доминантна, а для сорта *Вернал* рецессивна; вирулентность расы 36 для сорта *Канред* также рецессивна.

Потомство F1 можно довести до формирования телиоспор, а затем повторить скрещивания, чтобы получить F2, F3, B1 и т.д. (табл. 37).

Таким образом, вирулентность расы 9 к сорту *Арнаутка* контролируется одним доминантным геном, а к сорту *Вернал* — двумя рецессивными; вирулентность расы 36 к сорту *Канред* определяется одним рецессивным геном.

Как видно, основной вклад в изменение вирулентности в потомстве имеют доминантные и (в некоторых случаях) эпистатич-

Таблица 37 Расщепление по вирулентности к сортам пшеницы гибридов F2 между расами 9 и 36 *P. graminis f. sp. tritici* (M. Johnson, T. Newton, 1946)

Сорт	Число гибридов, вызвавших реакции		Ожидаемое расщепление
	0—1	4	
<i>Канред</i>	227	98	243,7 61,3 (3 : 1)
<i>Арнаутка</i>	83	242	81,3 : 243,7 (1 : 3)
<i>Вернал</i>	307	18	304,7 20,3 (15 : 1)

ные гены, т.е. фенотипическая вариация на 80—90 % обусловлена взаимодействующими генами, а вклад невзаимодействующих генов и внешних условий незначителен.

Используя описанный метод, Х. Флор провел перекрестный гибридологический анализ генов устойчивости льна к ржавчине и генов вирулентности возбудителя ржавчины *Melampsora lini* к льну (табл. 38).

Поскольку гетерозиготы хозяина и паразита (F1) соответственно устойчивы к обоим расам или авирулентны к обоим сортам, устойчивость и авирулентность управляются доминантными генами хозяина и паразита, а восприимчивость и вирулентность проявляются при наличии гомозиготных рецессивных аллелей доминантных генов устойчивости и авирулентности. В F2 отношение 3:1 устойчивых и восприимчивых к каждой расе гибридов

Таблица 38. Схема наследования устойчивости и вирулентности в системе «лен-ржавчина» (по Х. Флору, 1962)

Раса паразита	Сорт хозяина		F1		F2			Отношение
	<i>Оттава</i> <i>R1-r2r2</i>	<i>Бомбей</i> <i>r1r1R2-</i>	<i>R1r1R2r2</i>	110 (9)	32 (3)	43 (3)	9 (1)	R : S
22 (<i>a1a1A2-</i>)	+	—		+	+	—	—	3 : 1
24 (<i>A1-a2a2</i>)		+	—	+	—	+	—	3 : 1
F1 (<i>A1a1A2a2</i>)	—	—		+	—	—	—	15 : 1
F2 (<i>A1-A2-</i>)	-78 (9)	—	—	+	—	—	—	15 : 1
(<i>A1-a2a2</i>)	-23 (3)	+	—	—	+	—	—	3 : 1
(<i>a1a1A2-</i>)	+27 (3)	—	—		—	+	—	3 : 1
(<i>a1a1a2a2</i>)	+5 (1)	+	+	+	+	+		—

Примечание. Знаком (—) обозначена реакция устойчивости/авирулентности (что однозначно), знаком (+) — реакция восприимчивости/вирулентности.

растений и авирулентных, и вирулентных к каждому сорту гибридов паразита свидетельствует о присутствии одного доминантного гена. Наличие четырех классов реакций в F₂ показывает, что в популяциях хозяина и паразита имеется по два независимо расщепляющихся гена. Расщепление популяций F₂ хозяина или паразита, взаимодействующих с популяциями F₁ партнеров, по реакции на заражение соответствует 15 : 1, что указывает на наличие взаимодействующих пар генов хозяина и паразита. Эти данные привели Х.Флора к выводу о наличии взаимодействующих генов (вернее, генопродуктов) хозяина и паразита, сформулированному как теория "ген-на-ген". Как видно из приведенной таблицы, если растение обладает каким-либо доминантным геном устойчивости (*R1* у сорта *Оттава* или *R2* у сорта *Бомбей*), то оно может поражаться лишь такой расой патогена, которая имеет комплементарный ему рецессивный ген авирулентности (*a1* у расы 22 или *a2* у расы 24). Несовместимая реакция (устойчивости/авирулентности) проявляется только в том случае, если оба взаимодействующих гена (хозяина и паразита) доминантны.

Из теории Флора вытекает, что присутствие в геноме растения-хозяина доминантного гена устойчивости не выявляется при отсутствии соответствующего ему доминантного гена авирулентности (сорт *Оттава* поражается расой 22, а сорт *Бомбей* — расой 24, несмотря на наличие у них генов устойчивости *R1* и *R2* соответственно). В геноме паразита наличие доминантного аллеля авирулентности также не будет выявлено при отсутствии соответствующего ему гена устойчивости. Более того, в отсутствие каких-либо доминантных генов устойчивости хозяина соответствующие им гены вирулентности (рецессивные аллели генов авирулентности) паразитов также не будут выявляться.

Генетические исследования многих болезней растений, последовавшие после работ Х.Флора, в основном подтвердили его выводы. Было показано, что: 1) гены устойчивости (*R* — от англ. *resistance*) чаще доминантны, а гены вирулентности (*p* — от англ. *pathogenicity* или *a* — от *avirulence*) рецессивны; 2) *R*-гены часто аллельны или тесно сцеплены друг с другом, а *P*-гены обычно расщепляются независимо; 3) *R*- и *P*-гены обычно взаимодействуют на основе теории "ген-на-ген".

Первый вывод свидетельствует о том, что независимо от взаимодействующих генотипов паразита и хозяина возможны только два результирующих фенотипа — *R* и *S*, или "минус" и "плюс" или 0 и 1. Это положение хорошо иллюстрируется при изображении взаимоотношений паразита и хозяина в виде диагональной схемы (квадратной сетки) (табл. 39).

Второй вывод из параллельного изучения генетики устойчивости и вирулентности — наличие взаимодействий между партнерами не на геномном, а на генном уровне. В связи с этим встает

Таблица 39. Диаллельные взаимоотношения хозяина и паразита в системе "ген-на-ген"

Генотип растения-хозяина	Генотип паразита	
	<i>Aa</i> (или <i>Aa</i>)	<i>aa</i>
<i>RR</i> (или <i>Rr</i>)	– (R)	+ (S)
<i>Rr</i>	+ (S)	+ (S)

Примечание. R — устойчивость (несовместимость); S — восприимчивость (совместимость).

вопрос о необходимости изучения генетики партнеров только во взаимодействии, т.е. о межорганизменной генетике (Loegering, 1978). Возникновение межорганизменной генетики как отдельной дисциплины сделало возможным связать биохимические исследования факторов устойчивости растений и вирулентности паразитов с генетическими, т.е. перейти к анализу молекулярно-генетических механизмов вирулентности.

Агрессивность

Агрессивность, в отличие от вирулентности, — количественный признак, контролируемый многими генами и подверженный сильному влиянию не только генома, но и окружающей среды. Методы оценки количественных признаков и их генетического контроля описаны в предыдущей главе. Исследование агрессивности (процента зараженных колосьев) гибридов возбудителя головни ячменя *Ustilago hordei*, проведенное канадскими фитопатологами Г.Эмара и Г.Сиду, показало, что 35—48 % генетической вариации обусловлено внешними условиями и 42—43 % — аддитивными генами. Таким образом, общая вариабельность агрессивности на 80—90 % обусловлена невзаимодействующими генами и внешними условиями.

Генетические системы, участвующие в патологическом процессе

Применение молекулярных методов исследования позволило локализовать гены грибов, влияющие на их патогенность, и исследовать кодируемые ими белки.

В течение патогенеза в клетках грибов-паразитов последовательно протекают следующие процессы: прорастание спор и рост гифы по поверхности, трансдукция внешнего сигнала в ядро и экспрессия генов, участвующих в патогенезе; формирование инфекционных структур, необходимых для внедрения в ткань; синтез

ферментов, деградирующих полимеры, из которых построены покровы клеток и тканей; подавление защитных свойств растительной ткани; питание и формирование потомства.

Рост гифы на поверхности растения

Грибная гифа плотно прикрепляется к гидрофобной поверхности за счет разнообразных соединений, находящихся на ее поверхности.

Интегрины как медиатор взаимодействий. Интегрины — семейство животных белков, которые пронизывают клеточную мембрану и, взаимодействуя с рецепторами интегринов соседних клеток, обеспечивают клеточную адгезию. Поскольку цитоплазматический «хвост» молекул интегрин короткий и не подвержен энзиматическому узнаванию, молекулы через адаптерный белок, связывающий интегрин с цитоскелетом, протеинкиназами и трансмембранными рецепторами факторов роста, осуществляют трансдукцию сигнала. Этот путь трансдукции назван *интегриновым кластером*. Интегрины обнаружены у грибов и оомицетов. Они необходимы для апикального роста гифы, ориентации микрофиламентов цитоскелета и прикрепления гиф к поверхности, а также обеспечивают тигмотропизм — рост гифы строго перпендикулярно антиклинальным клеточным стенкам эпидермальных клеток (такой рост облегчает нахождение устьиц).

Гидрофобины. Среди рано экспрессируемых генов *Magnaporthe grisea* изолирован ген *MPG1*, продукт которого низкомолекулярный белок гидрофобин необходим для прикрепления гифы к гидрофобной поверхности листа и образования инфекционных структур (апрессориев).

Трансдукция сигнала

Первый этап трансдукции — принятие внешнего сигнала и перенос его через цитоплазматическую мембрану. У *Magnaporthe grisea* сигнал от гидрофобной поверхности листа принимает рецептор, контролируемый геном *PTH11*, и передает на G-белки — критическое звено в пути распространения сигнала в клетке (гетеромерные белки, связывающие ГТФ), которые направляют поток сигналов от рецепторов внутрь клетки. Их молекулы состоят из трех субъединиц — полипептидных цепей, называемых (от большей к меньшей) α , β и γ . Первая субъединица специфична, тогда как остальные могут не различаться. В состоянии покоя все три единицы образуют комплекс, в котором α -субъединица связана с гуанизиндифосфатом (ГДФ). После принятия сигнала рецептором конформация последнего изменяется и он связывается

с G-белком, вследствие чего α -субъединица освобождает ГДФ. Его место сразу же занимает ГТФ, активируя тем самым α -субъединицу, которая отделяется от комплекса и движется в цитоплазму, где связывается с эффектором, активизирует его фосфатом ГТФ и, опять имея связь с ГДФ, возвращается на место в G-комплекс.

У возбудителя рака каштана *Criphonectria parasitica* клонированы два гена, кодирующие α -субъединицу G-белка: *gpg-1* и *gpg-2*. Продукт первого белок GPG-1 имеет высокую область гомологии (98 %) с GNA-белком *Neurospora crassa*. Многие штаммы *C. parasitica* имеют слабую вирулентность и измененные морфологические признаки вследствие зараженности вирусом, обладающим двухцепочечной РНК (гиповирусом, с. 57). Уровень содержания белка GPG-1 в мицелии, зараженном гиповирусной dsРНК, оказался очень низким. Редукция уровня белка GPG вследствие ко-супрессии антисмысловой копией *gpg-1*, как и делеции в обоих генах, вызывали редукцию мицелиального роста, изменение морфологии колонии (снижение пигментации, аспо-

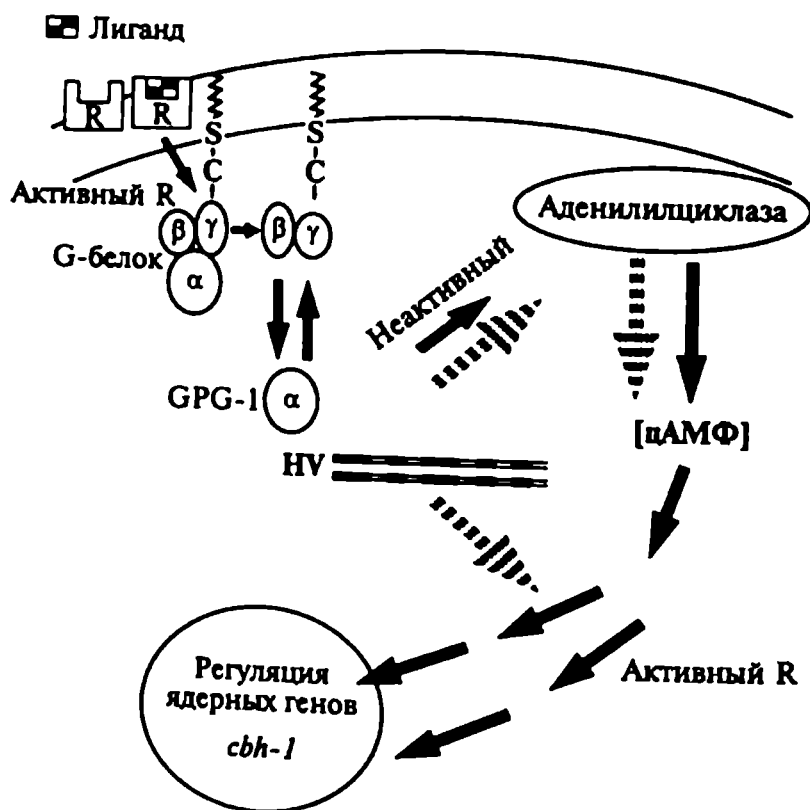


Рис. 78. Схема, показывающая, как гиповирус (HV) блокирует индукцию факторов вирулентности *Criphonectria parasitica*, таких, как ферменты, деградирующие клеточную стенку растения-хозяина (целлобиогидролазы и др.) (P. Tudzynski, E. Tudzynski, 1998): R — рецептор; G-белок — белок, связывающий ГТФ; *cbh-1* — ген целлобиогидролазы I

рогенность, женскую стерильность), снижение активности лакказы и падение вирулентности — нарушения метаболизма, сходные с теми, которые наблюдаются у гиповирулентных штаммов (см. с. 57). В частности, прекращались индукция целлюлозой гена целлобιοгидролазы (*chl*) и секреция целлюлазы. Мутации второго гена (*cprg-2*) не влияли на вирулентность. Полагают, что фосфорилированный α -белок активирует аденилциклазу, влияя тем самым на циклоаденилатный путь трансдукции сигнала, приводящий к индукции экспрессии генов, необходимых для патогенеза (в частности, *cbh I*). Гиповирус, со своей стороны, вмешивается в этот путь трансдукции (рис. 78).

Для формирования апрессориев у возбудителя пирикулярноза риса *Magnaporthe grisea* необходима активность гена *PMK1*. Гомологи этого гена у других возбудителей пятнистостей *PTK1* *Pyrenophora teres* и *CMK1* у *Colletotrichum lagenarium*, а также *BMP1* — у некротрофа *Botrytis cinerea*, *FMK1* — у сосудистого патогена *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* и *FUZ7* — у возбудителя пузырчатой головки кукурузы биотрофа *Ustilago maydis* не влияют на линейный рост и спороношение, но необходимы для проявления патогенности. Эти гены контролируют синтез митогенактивного белка (МАР) киназы, аналогичной дрожжевой киназе *Fus3* (с. 162). Этот белок регулирует содержание внутриклеточной цАМФ в апрессории.

Формирование инфекционных структур

Ростковая трубка ржавчинных грибов образует над устьицей апрессорий, из которого вертикально вниз растет гифа. В подустыичном пространстве она образует расширение — подустыичное вздутие, от которого в окружающие клетки вырастают инфекционные гифы, внедряющиеся непосредственно в клетки (рис. 79). Такой морфогенез протекает в зараженных клетках, но отдельные его этапы можно индуцировать *in vitro* выращиванием на коллоидных мембранах, циклическими мононуклеотидами, гормоном созревания растений этиленом и другими воздействиями. С помощью таких воздействий выделено несколько генов, регулирующих морфогенез: *INF* (*infection*) или *PIG* (*in plants induced genes*). Первым белком, связанным с дифференцировкой, оказался кальмодулин — белок, регулирующий организацию цитоскелета. Он необходим для изменения ориентации микротрубочек и микрофиламентов при переходе от растущей по поверхности гифы к апрессорию. Белки Саp20 и Саp22 — гликопротеины, связанные с клеточной стенкой апрессория. Один из них нужен для формирования гаустория, второй — для его функционирования. В апрессориях многих грибов начинается биосинтез меланина — тем-

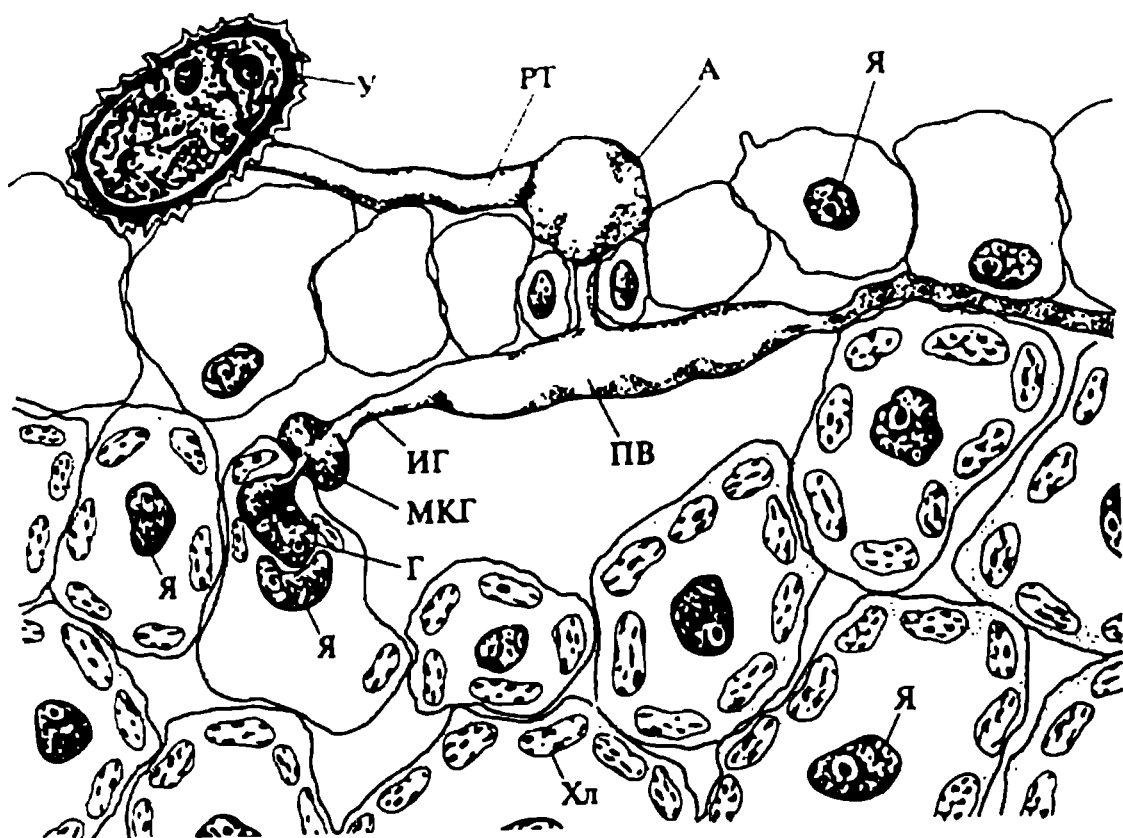


Рис. 79. Инфекционные структуры ржавчинного гриба (Л. Н. Андреев, Ю. М. Плотникова, 1989):

У — урединиоспора; РТ — ростковая трубка; А — апрессорий; ИГ — инфекционная гифа; ПВ — подустичное вздутие; МКГ — материнская гаустория; Г — гаусторий; Я — ядра растительных клеток; Хл — хлоропласты

ноокрашенного пигмента, синтезирующегося полимеризацией поликетидного предшественника 1,8-дигидронафталина (рис. 80). Откладываясь в клеточной стенке апрессория, не контактирующей с поверхностью листа, меланин играет роль молекулярной ловушки, повышающей тургорное давление внутри апрессория и способствующей росту инфекционной гифы внутрь листа. Мутанты, имеющие светлоокрашенные гаустории, не инфекционны. В биосинтезе меланина участвуют три несцепленных гена: *ALB1*, *RSY1* и *BUF1*. Их мутации придают мицелию и гаусториям белую, розовую или темно-желтую окраску соответственно. Первый из этих генов контролирует синтез поликетидсинтетазы, второй — сциталондегидратазы, третий — НАДФ-зависимой полигидрокси-нафталинредуктазы.

В апрессориях *M. grisea* экспрессируется белок Psilp, который гомологичен семейству мембранных белков животных тетраспаринов. Эти белки входят в комплекс мембранного сигналинга, ответственного за клеточную адгезию, дифференциацию и движение. Те же функции — адгезию и дифференциацию — контро-

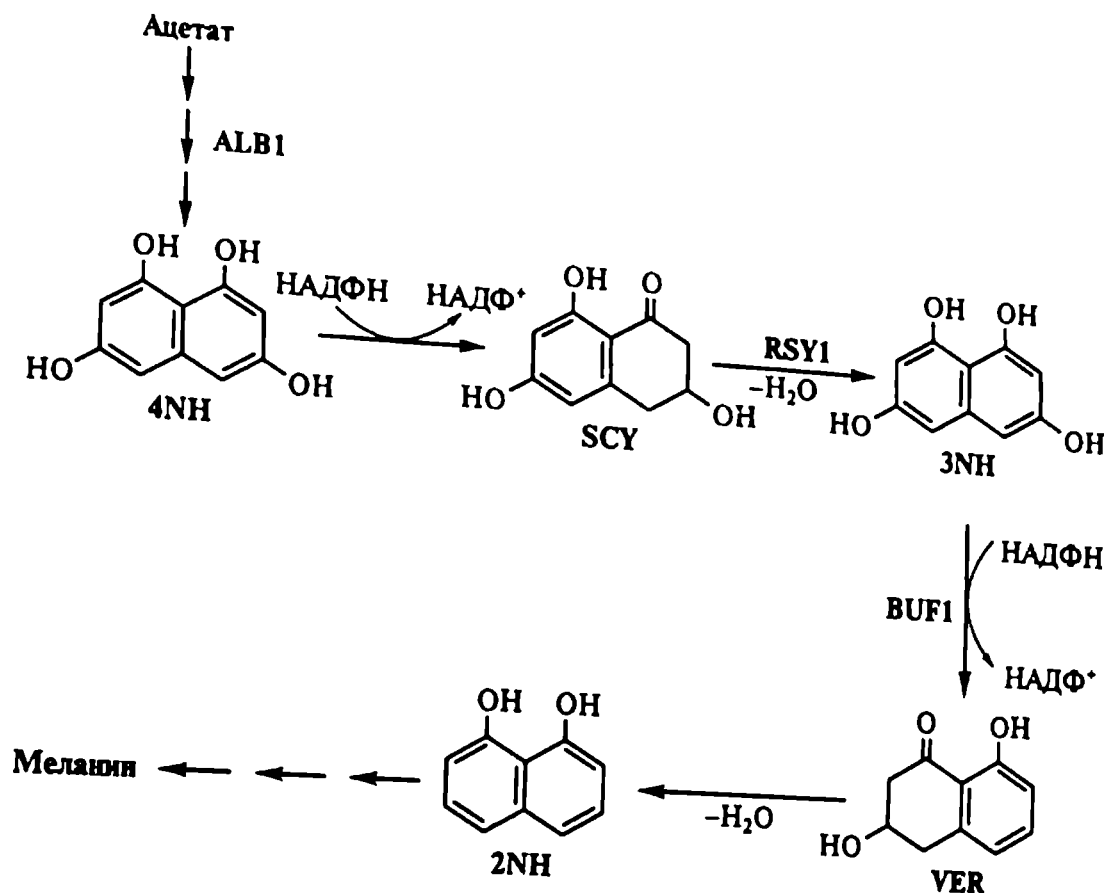


Рис. 80. Поликетидный путь биосинтеза меланина грибами
(R.J. Howard, B. Valent, 1996):

4NH — тетра-оксинафталин; SCY — сшпалон; 3NH — триоксинафталин; VER — вермслон; 2NH — диоксинафталин; ALB1, RSY1, BUF1 — положения блоков биосинтеза меланина соответствующими мутациями

лирует этот белок и в мембранах гаусториев. Интересно, что мРНК Psil обнаружена во всех клетках, а белок — только в гаусториях, т.е. его регуляция осуществляется на уровне трансляции.

Наконец, в цитоплазме апрессориев обнаружен белок ACE1 с комбинированными ферментными свойствами поликетидсинтетазы/ нерибосомальной пептидсинтетазы. Продукт его ферментативной активности неизвестен, но, возможно, играет роль на ранних этапах взаимодействия гаустория с клетками хозяина.

В апрессориях синтезируются также факторы вирулентности циклофиллины, обнаруженные у бактерий, грибов, растений и животных. Циклофиллины имеют активность ферментов пептидилпролилизомераз, которые участвуют во многих процессах, включая ответ на стресс, регуляцию клеточного цикла, Ca^{2+} -сигнальной системы, контроль репрессии транскрипции вследствие изомеризации пептидных связей. Мутанты гриба *Magnaporthe grisea* по гену, контролирующему синтез циклофиллинов, CYP1, не инфекционны, их апрессории не развивают необходимого для пробивания клеточной оболочки тургорного давления. Циклофил-

лин требуется также для вирулентности по отношению к человеку гриба *Cryptococcus neoformans*. Циклофиллины являются также мишенью циклического опепедапептида *циклоспорина* — продуцируемого многими грибами иммуносупрессора позвоночных животных и человека. Предполагают (Viand et al., 2002), что циклофиллин соединяется с кальмодулинзависимой фосфатазой — кальциневрином А, который также является мишенью циклоспоринов. У грибов кильциневрин необходим для патогенности, а у позвоночных — для экспрессии генов в Т-клетках. В частности, при связывании кальциневрина циклоспорином ингибируется экспрессия гена ИЛ-2.

Деградация растительных покровов

Кутикула. Гифы многих фитопатогенных грибов (возбудителей ложной мучнистой росы, пирикулярриоза риса, фузариозов и др.) внедряются непосредственно в эпидермальные клетки. При этом грибной гифе необходимо преодолеть барьер в виде кутикулы, покрывающей большинство органов растений. Кутикула представляет собой нерастворимый кутин (полимер $C_{16}—C_{18}$ жирных кислот, соединенных эфирными связями), погруженный в гидрофобный комплекс — воск, состоящий из неполярных $C_{20}—C_{32}$ алифатических соединений — углеводов, жирных кислот, спиртов, эфиров. Разрушение кутинового барьера осуществляет фермент кутиназа, которая катализирует гидролиз эфирных связей (обладает эстеразной активностью). Кутиназа — индуцибельный фермент, который экспрессируется гидролизатом кутина и репрессруется глюкозой. У паразита гороха *Fusarium solani f. sp. pisi* небольшая концентрация кутиназы образуется конститутивно вследствие наличия неиндуцибельного гена, имеющего слабый промотор. При контакте с кутином этот фермент вызывает разрушение небольшого числа молекул кутина и появление олигомеров, индуцирующих экспрессию второго кутиназного гена, обладающего мощным промотором и продуцирующего активную кутиназу. Мутанты *F. solanum*, дефектные по продукции кутиназы, потеряли патогенность к гороху. После трансформации кутиназного гена *F. solani* в геном раневого паразита авокадо *Mycosphaerella* sp., неспособного заражать неповрежденные плоды, этот гриб стал продуцировать кутиназу и заражать неповрежденные плоды.

Клеточная стенка. Проникновение в клетку растения возможно только после преодоления барьера клеточной стенки, которая подобно прочному каркасу поддерживает протопласт, защищая его от механических и осмотических повреждений. Основной компонент клеточной стенки — полисахариды, соединенные друг с другом ковалентными и водородными связями и образующие

сложную сеть, из которой сложены первичная стенка растущей клетки, вторичная (более жесткая) стенка, определяющая форму клетки, и срединная пластинка — межклеточный цемент, склеивающая отдельные клетки в ткани.

По способности экстрагироваться различными растворителями полимеры клеточной стенки разделяют на *целлюлозу* (линейные фибриллы β -глюкана), *гемичеселлюлозу* (разветвленные полимеры ксилана, ксилоглюкана, арабинана и др.) и *пектин* (метилованный рамногалактуронан). Многие фитопатогенные грибы обладают комплексом ферментов, разрушающих целлюлозу (целлюлазы), гемцеллюлозу (ксилаказы) и пектин (пектиназы). Активные целлюлазы имеют древоразрушающие грибы; у паразитов травянистых растений наиболее активны пектиназы. Разрушая пектин, они, во-первых, разрывают связи между отдельными молекулами целлюлозы, нарушая тем самым композицию клеточной стенки и обеспечивая доступ к протопласту; во-вторых, при сильном воздействии на клетку (у некротрофов) вызывают гибель протопластов вследствие осмотических эффектов; в-третьих, разрушая пектин срединных пластинок, обеспечивают продвижение паразита внутри растения, а при сильном повреждении вызывают мацерацию и распад зараженной ткани (гнили); в-четвертых,

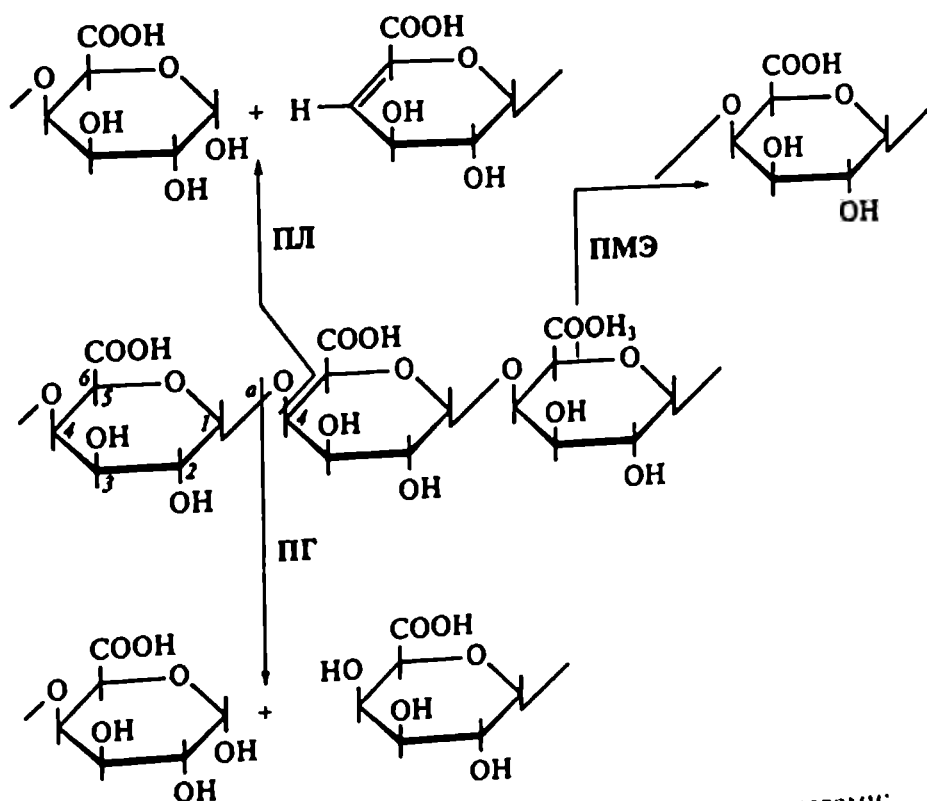


Рис. 81. Пути деградации молекулы пектина пектиназами:
ПЛ — пекталиназа; ПМЭ — пектинметилэстераза; ПГ — (эндо) полигалактуроназа

обеспечивают углеводное питание паразита продуктами распада пектина.

Пектиназы грибов имеют различные механизмы воздействия на молекулу пектина и разную субстратную специфичность (рис. 81).

Пектинметилэстеразы (ПМЭ) деметилируют полигалактуронид с образованием полигалактуроновой кислоты. Свободные карбоксильные группы в растении обычно соединяются с двухвалентными металлами (Ca^{2+}), образуя соли — пектаты. В сосудах ксилемы, пораженных сосудистыми инфекциями, пектаты кальция поглощают воду и образуют набухающие гели — эмболы, препятствующие ксилемному току и являющиеся одной из причин инфекционного увядания — вилта. Клонированный ген ПМЭ *Aspergillus niger* имеет 6 интронов и кодирует белок из 314 аминокислот, имеющий 30 % гомологии с ПМЕ фитопатогенной бактерии *Erwinia chrysanthemi*.

Полигалактуроназы (ПГ) вызывают распад полигалактуронида вследствие гидролиза глюкозидных связей между мономерами. По месту действия ферменты разделяют на **эндоПГ**, осуществляющую разрывы по всей молекуле пектина и отщепляющие олигогалактурониды разной длины, и **экзоПГ**, которая отщепляет димеры от нередуцированных концов пектинового полимера. Все клонированные гены ПГ грибов имеют размеры 1100 — 1350 н. п., от одного до четырех интронов (ПГ *Sclerotinia sclerotiorum* не имеет интронов) и 60—65 % гомологии по аминокислотным последовательностям.

Пектамплаза (ПЛ) катализирует трансэлиминативный распад пектина на олигогалактурониды, но в отличие от действия эндоПГ в данном случае образуются продукты с двойными связями. Гены ПЛ *Aspergillus nidulans*, *Nectria haematococca* и *Glomerella cingulata* чрезвычайно разнообразны по структуре (числу и расположению интронов) и имеют низкую гомологию.

Большинство фитопатогенных грибов продуцирует несколько пектолитических ферментов, каждый из которых может кодироваться семейством генов и существовать в разных изоформах, различающихся оптимумом pH, температуры, субстратной специфичности. Эти свойства могут обуславливать возрастную и тканевую специализацию патогенов. Например, всходы фасоли, в клеточных стенках которых пектин метилирован, более восприимчивы к ризоктониозу, чем зрелые растения, у которых пектин содержится главным образом в форме пектата кальция. ПГ гриба *Rhizoctonia solani* активно деградирует эстерифицированный пектин, но не пектаты, чем и обусловлена устойчивость взрослых растений.

Вышесказанное, по-видимому, является причиной чрезвычайно сложного генетического контроля ферментов фитопатогенных

грибов, осуществляющих деградацию углеводных полимеров. Так, у паразита кукурузы *Cochliobolus carbonum* описаны по крайней мере две ПГ, кодируемые двумя генами, три глюканазы (два гена), пять ксиланаз (четыре гена), из которых *xyl1* экспрессируется *in vitro* и *in planta*, *xyl2* — только *in vitro* и *xyl3* — только *in planta*.

Из пяти генов ПГ *Botrytis cinerea* один экспрессируется конститутивно, остальные — индуцибельны; по-видимому, их индукция происходит под влиянием олигогалактуронидов, образующихся в результате воздействия неиндуцибельного фермента. Благодаря большому разнообразию ферментов и кодируемых их генов исключение отдельных ферментов вследствие мутаций не приводит к драматическому снижению патогенности вследствие компенсационного действия остальных. У гриба *Magnaporthe grisea* двойная мутация генов *xyl1* и *xyl2* вызывает активацию (или экспрессию) «молчащих» генов, кодирующих дополнительные ксиланазы.

Подавление защитного потенциала растений

Умерщвление клеток хозяина

Самый грубый способ подавления защитного потенциала живой клетки — ее умерщвление. Поэтому некротрофные паразиты, извлекающие питание из мертвых клеток, выделяют токсические продукты, летально воздействующие на клетки хозяина. Большинство токсинов некротрофов неспецифичны. Они названы *вивотоксинами*, ибо метаболиты грибов — кандидаты на их роль — должны быть выделены не только из среды роста *in vitro*, но и из зараженных растений (*in vivo*).

По химической природе вивотоксины разделяют на несколько групп:

органические кислоты (щавелевая кислота возбудителя белой гнили *Sclerotinia sclerotiorum*);

циклические ароматические соединения (кумарины, азотсодержащие алкалоиды, периленхиноны) — альтернариевая кислота (продуцент *Alternaria solani*), фузариевая кислота (*Fusarium oxysporum*), церкоспорин (*Cercospora* spp.);

терпеноиды (трихотеценовые токсины *Fusarium*);

циклические пептиды (тентоксин *Alternaria alternata*);

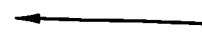
гликопептиды (токсин возбудителя болезни мальсекко цитрусовых *Phoma tracheiphyllo*);

полипептиды (цератоульмин — 13kD токсин возбудителя голландской болезни ильмов *Ophiostoma ulmi*).

По механизмам токсического воздействия на растительные клетки токсины разделяют на ингибиторы ферментов, мембра-

Рис. 82. Биосинтез трихотеценов грибами (M. Kimura, 2001).

Синтез трихотеценов I-типа включает серию ферментативных реакций, начиная с циклизации фарнезилфосфата в триходиен триходиенсинтетазой (TRI5). Последующие биосинтетические шаги включают окисление, изомеризацию и вторичную циклизацию до изотриходермола — первого интермедиата, имеющего токсичный трихотеценовый скелет. Рядом со стрелками обозначены гены, продукты которых осуществляют соответствующие биосинтетические шаги



ноактивные вещества, генераторы активных форм кислорода в зараженных клетках, ингибиторы белкового синтеза и др.

Генетическую регуляцию синтеза низкомолекулярных вторичных метаболитов, обладающих свойствами вивотоксинов, рассмотрим на примере трихотеценовых токсинов фузариевых грибов. Эти токсины представляют интерес, во-первых, потому, что их продуценты вызывают болезни пшеницы, ячменя, кукурузы, наносящие значительный экономический ущерб, и, во-вторых, потому, что содержащиеся токсины растительные продукты токсичны для людей и сельскохозяйственных животных (вызывают потерю аппетита, дерматиты, анемию, геморрагический сепсис, иммуносупрессию). Эти соединения, к которым принадлежит несколько антибиотиков грибного происхождения, ингибируют синтез белка у эукариот.

Биосинтез трихотеценовых токсинов показан на рис. 82. Как видно, ключевой фермент, осуществляющий циклизацию фарнезилпирофосфата в триходиен (триходиенсинтетаза), контролируется геном *Tri5*. После серии окислений, изомеризации и вторичной циклизации образуется два класса соединений (А и В), различающихся наличием или отсутствием кето-группы при С-8 атоме трихотеценового скелета, — Т-2 токсин *Fusarium sporotrichoides* и дезоксиниваленон (ДОН) *F. graminearum*.

Молекулярные исследования биосинтеза трихотеценовых токсинов начались после того, как был очищен ключевой фермент триходиенсинтетаза и с его помощью клонирован ген *Tri5*. Было обнаружено, что космида, несущая этот ген, комплементирует мутации и по другим генам, влияющим на последующие этапы синтеза трихотеценов. Отсюда сделан вывод о сцеплении этих генов в общем кластере размером 25 тыс. н. п. Кластеры для обоих видов *Fusarium* (*F. sporotrichoides* и *F. graminearum*) имели высокую степень гомологии, фланкированы одинаковыми генами тирозиназы и полисахариддеацетилазы и содержат по крайней мере 11 генов, связанных с биогенезом трихотеценов (рис. 83). Среди них есть биосинтетические гены — *Tri4* (P450 монооксигеназа, осуществляющая гидроксилирование триходиена), *Tri3* (15-0-ацетилтрансфераза), *Tri11* (P450 монооксигеназа, участвующая в гидроксилировании С-15) и регуляторные — *Tri6* (активатор транскрипции), *Tri12* (регулятор выхода трихотеценов из клетки). Ген

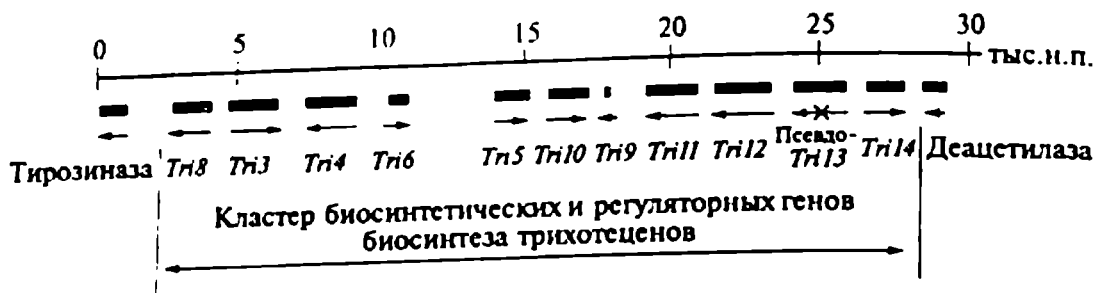


Рис. 83. Геномная организация кластера генов, регулирующих биосинтез трихотеценов у *Fusarium graminearum* (M. Kimurta et al., 2001).
Стрелками показаны направления транскрипции. Символ X над *Tri 13* показывает, что этот ген не кодирует функциональный продукт

Tri7 (4-О-ацетилтрансфераза) у *F. sporotrichoides*, *F. graminearum* отсутствует, а *Tri13* (белок типа P450) находится в виде псевдогена. По-видимому, эти ферменты не необходимы в синтезе токсинов В-типа, поэтому кодирующие их гены утрачены в ходе эволюции.

Клетки грибов-продуцентов токсинов не повреждаются высокотоксичными соединениями, каковыми являются трихотецены, по трем причинам.

1. На определенном этапе происходит ацетилирование атома С-3 ацетилтрансферазой, кодируемой геном *Tri101*. Это маскирует токсичность трихотеценового скелета. На последних этапах биосинтеза токсинов 3-О-ацетильная группа удаляется.
2. Мембранный белок, кодируемый геном *Tri12*, быстро удаляет токсины из клеток.
3. Возможно, у грибов, продуцирующих фузариотоксины, модифицирован сайт рибосомы — мишень действия трихотеценов.

Подавление защитного потенциала клеток

Некоторые грибы выделяют в зараженные ткани вещества, обладающие высокой токсичностью и одновременно чрезвычайно высокой специфичностью к определенным генотипам растений (токсины, специфичные для хозяев, или *патотоксины*). Например, токсин гриба *Cochliobolus victoria* викторин убивает проростки сортов овса, имеющих ген *Pc2* (сорт *Виктория* и его потомки) в концентрации 0,3 нг/мл, в то время как для сортов овса, не имеющих этого гена, и для других растений доза, в миллион раз более высокая, не летальна. Родственный ему гриб *C. heterostrophus* (раса Т) вызывает ожог листьев и гибель всходов кукурузы, обладающей техасским типом цитоплазматической мужской стерильности (Т-цмс), но слабо патогенен для сортов с нормальной цитоплазмой. Кукуруза, имеющая мужскую стерильность,

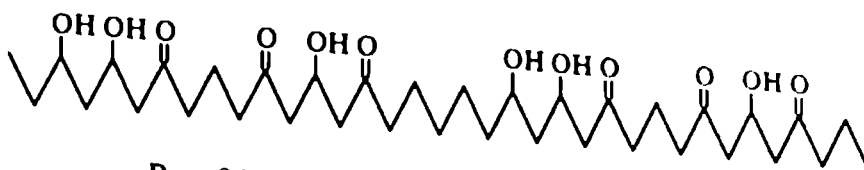


Рис. 84. Т-токсин *Cochliobolus heterostrophus*

облегчает производство высокоурожайных межлинейных гибридов и выращивается на больших площадях во многих странах, в том числе в России. Токсическое действие на нее оказывает Т-токсин — линейный поликетол (рис. 84), синтез которого находится под контролем двух генов: FksI (ToxA) ответствен за синтез фермента поликетидсинтазы, которая строит поликетидную цепочку, а ген DecI (ToxB) контролирует синтез карбоксилазы, удаляющей терминальные карбоксильные группы. Эти гены расположены на разных хромосомах. Т-токсин вызывает повреждение мембран митохондрий кукурузы, имеющих Т-цмс. В результате его действия происходит потеря Ca^{2+} и НАД^+ , разобщение окислительного фосфорилирования. Во внутренней мембране Т-митохондрий имеется белок с молекулярной массой 13 кДа (URF13), отсутствующий в нормальных митохондриях. Он ответствен за мужскую стерильность и чувствительность к токсину. В соединении с токсином белок URF13 полимеризуется и образует трансмембранные каналы, через которые происходит утечка электролитов.

Детоксикация активных форм кислорода

Одним из ранних ответов растительной клетки на заражение является «окислительный взрыв», приводящий к накоплению в клетке высокотоксичных короткоживущих активных форм кислорода (АФК) — супероксидного аниона (O_2^-), гидроксильного радикала ($\cdot OH$) и перекиси водорода (H_2O_2). АФК — это не только источники высокотоксичных соединений, но и участники НАДФ-оксидазной сигнальной системы в клетке, осуществляющие активацию факторов транскрипции. Поэтому ферменты паразитов, разлагающие АФК, играют исключительную роль в патогенезе. Показано, что инактивация гена супероксиддисмутазы у *Glomerella graminicola*, не влияя на рост гриба на питательной среде, резко подавляет его патогенность.

Детоксикация токсических веществ растений

Одна из важнейших систем клеточной защиты растений от паразитов основана на освобождении токсических веществ из гликозидов, находящихся, как правило, в вакуолях. Эта система вы-

сокоэффективна и универсальна. Однако многие фитопатогенные грибы в процессе коэволюции с растениями выработали механизмы, нейтрализующие эту систему. Такие механизмы можно свести к следующим.

- Мягкое, не повреждающее мембраны воздействие на клетки растений, характерное для биотрофных паразитов. Например, внутриклеточный паразит крестоцветных *Plasmodiophora brassicae*, возбудитель килы, находится в живых клетках с неповрежденными мембранами, поэтому его присутствие не вызывает появления продуктов гидролиза горчичных масел высокотоксичных изороданидов ($R-N=C=S$). В процессе роста опухоли (килы) покровные ткани растрескиваются, и ранки заселяются почвообитающими гнилостными микроорганизмами. Последние, будучи некотрофами, разрушают зараженные клетки, вызывая образование токсичных агликонов, но к этому времени плазмодии возбудителя килы преобразуются в споры, имеющие толстые оболочки и устойчивые к токсинам.

- Изменение чувствительного к токсину сайта. Гриб *Stemphilium loti* вызывает пятнистость листьев цианогенного лядвенца, у которого в результате гидролиза глюкозида линамарина образуется сильнейший дыхательный яд цианид ($H-C\equiv N$). У паразитного гриба высокий вклад в дыхание приходится на альтернативный, нечувствительный к цианиду путь.

- Модификация токсических веществ до менее токсичных. Этот механизм определяет специфическую патогенность штаммов широко специализированных грибов к устойчивым видам растений. Например, локализованный в корнях стеридный гликозид (сапонин) авенацин защищает овес от заражения возбудителем корневой гнили *Gaeumannomyces graminis*. Штаммы этого гриба, способные заражать овес (*G. graminis* var. *avenae*), продуцируют специфичный фермент β -глюкозидгидролазу — авенациназу, отщепляющую сахарные остатки и переводящую авенацин в нерастворимую, менее токсичную форму. Используя поликлональные антитела к очищенной авенациназе в качестве зонда, удалось клонировать кодирующий ген. Его трансформация в геном *Neurospora crassa* сделала гриб нечувствительным к авенациназе *in vitro*. Инактивация гена транспозоновым мутагенезом привела к потере способности деградировать авенацин и заражать овес при сохранении патогенности к непродуцирующей авенацин пшенице.

Детально исследована генетика патогенности некоторых штаммов *Nectria haematococca* (аноморфа — *Fusarium solani* f. sp. *pisi*) к гороху. При выращивании этих штаммов на питательной среде, содержащей фактор устойчивости гороха к болезням фитоалексин пизатин, рост мицелия начинается после некоторого лаг-периода. Рост сопровождается снижением содержания пизатина в среде и накоплением его деметилированного производного (рис. 85). Сле-

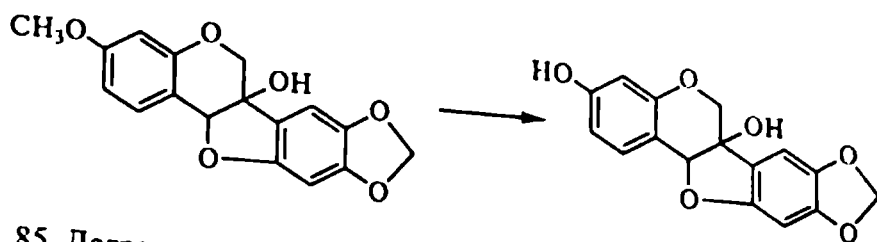


Рис. 85. Дегградация пизатина ферментом пизатиндеметилазой *Nectria haematococca* (G. van Etten et al., 1975)

довательно, пизатин индуцирует синтез фермента пизатиндемети-лазы. Среди большого числа природных штаммов *N. haematococca* обнаружены как высоко патогенные для гороха, так и непатоген-ные, причем степень патогенности коррелирует со способностью деметилировать пизатин. При скрещивании патогенного и непато-генного штаммов в аскоспоровом потомстве наблюдается расщеп-ление на две группы — патогенные и непатогенные, причем толь-ко первые обладают способностью деметилировать пизатин.

Продукт дегградации пизатина слабо токсичен для грибов. Кроме того, он подвергается дальнейшему разрушению до летучих ве-ществ (CO_2 и др.). Дегградация пизатина осуществляется фермен-том цитохром Р-450-монооксигеназой, связанным с мембраной. Для проявления его активности требуются цитохром Р-450 и НАДФ-цитохром Р-450-редуктаза. Синтез фермента индуцирует-ся пизатином и репрессируется глюкозой и аминокислотами.

У *N. haematococca* обнаружено несколько генов, контролирующих синтез деметилазы. Ген *Pda1* обеспечивает высокую активность фер-мента, *Pda2* и *Pda3* — низкую, *Pda6* — промежуточную. Рецессив-ные аллели этих генов представляют собой делеции. При разделе-нии хромосом *N. haematococca* с помощью импульсного электрофо-реза было обнаружено наличие в геноме мелких В-хромосом, нео-бязательных для существования организма, но несущих гены *Pda*. Штаммы, потерявшие В-хромосомы, не могут заражать горох.

Ген *Pda6* был клонирован и перенесен в геномы других гри-бов — паразита кукурузы *Cochliobolus heterostrophus* и сапротрофа *Aspergillus nidulans*. Оба трансформанта стали резистентными к пизатину *in vitro*, что свидетельствует об экспрессии гена, одна-ко только первый приобрел способность заражать горох. Этот опыт свидетельствует не только о роли деметилазы пизатина в пато-генности для гороха, но и о различиях между базовой патоген-ностью и специфической вирулентностью. Фитопатогенный вид *C. heterostrophus* обладает базовой патогенностью, которая, по-ви-димому, обусловлена многими генами, поэтому приобретение одного дополнительного гена оказалось достаточным для его ви-рулентности по отношению к новому растению. Сапротроф *A. nidulans* не имеет базовой патогенности, поэтому один лишь ген вирулентности не способен обеспечить способность к паразитизму.

ГЕНЕТИКА ПАТОГЕННОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МИКОЗОВ

Современные направления исследований генетики грибов, имеющих значение для медицины

Прогресс медицинской микологии, охватывающей проблемы как микозов, так и грибной аллергии, микотоксикозов и отравлений, неразрывно связан с накоплением знаний о болезнетворных грибах и механизмах обусловливаемой ими патологии.

Наличие около 500 патогенных или условно-патогенных возбудителей грибковых инфекций человека, множества токсигенных и аллергенных грибов затрудняет поиск общих закономерностей грибных заболеваний. В то же время внимание современных исследователей сфокусировано на изучении наиболее значимых возбудителей грибных заболеваний, например самых распространенных или опасных агентов поверхностных или глубоких микозов, аллергенных грибов с наибольшей частотой выявления в воздухе и экономически значимых токсигенных контаминантов зерна.

Эпоха молекулярной генетики и преобладание молекулярно-генетических методов в биомедицинских исследованиях последних лет в полной мере затронули медицинскую микологию. Сохраняющиеся высокими смертность и затраты на лечение инвазивных микозов направили зарубежные исследовательские коллективы на изучение в первую очередь возбудителей оппортунистических инфекций: кандидоза, криптококкоза, аспергиллеза. К объектам активного изучения медицинских микологов присоединились некоторые виды облигатно-патогенных грибов, рассматриваемые особоввиду заявленной возможности их применения как орудия биотерроризма (*Coccidioides* spp.). Отражая общие тенденции в генетических исследованиях, значительное развитие получила геномика грибов, имеющих большое значение для медицины. В списке секвенированных геномов микроорганизмов заметны и многие грибные, в том числе известные виды патогенных или токсигенных грибов.

В настоящее время осуществлены проекты полного или частичного секвенирования геномов главных возбудителей оппортунистических микозов человека: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* и *Cryptococcus neoformans*, диморфных агентов эндемических микозов *Histoplasma capsulatum* и *Coccidioides immitis* и других СПИД-ассоциированных инфекций (*Pneumocystis*), токсигенных грибов (*Fusarium graminearum*). Начаты новые проекты по изучению ге-

номов других важных возбудителей как родственных видов микроорганизмов с уже выделенными генетическими последовательностями (*Candida*, *Aspergillus*), так и представителей отдельных родов. Создана так называемая инициатива по изучению грибных геномов (FGI), сформированная вокруг американского центра генетических исследований (Интернет: <http://www-genome.wi.mit.edu/>). В рамках данного международного проекта осуществляются исследование геномов разных грибов и поиск новых и перспективных объектов для изучения. К концу 2003 г. общий список изучаемых и потенциальных объектов насчитывал 44 вида грибов.

В проекте FGI поставлена цель фокусировки исследователей на основных, с точки зрения организаторов, видах, имеющих значение для медицины. После 4 видов, признанных главными (*C. albicans*, *A. fumigatus*, *H. capsulatum* и *C. immitis*), в первом из составленных списков потенциальных объектов изучения присутствовали также и другие известные возбудители микозов — *Rhizopus oryzae*, *Trichophyton rubrum*, *Aspergillus flavus* и *A. terreus*, а во второй список вошли почти все основные патогенные (*Sporothrix schenckii*, *Penicillium marneffeii*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Exophiala dermatitidis* и др.) и токсигенные (*Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Stachybotrys chartarum*) грибы. Геномы *Coccidioides immitis/posadasii* (штамм KS, размер генома 29 Mb) и *Rhizopus oryzae* (штамм RA99-880, размер генома 35 Mb) находятся в стадии секвенирования. Геномы *C. albicans*, *A. fumigatus* и *C. neoformans* были секвенированы и изучены разными коллективами.

Исследования генома *Candida albicans*

Вид *C. albicans* считается наиболее изученным представителем рода *Candida* и главным возбудителем кандидоза всех локализаций. Носительство *C. albicans* большинством населения обеспечивает лидерство данного гриба в этиологии грибковых инфекций слизистых оболочек, СПИД-ассоциированных и оппортунистических инвазивных микозов. Интерес к патогенным и адапционным свойствам *C. albicans*, стимулирующий исследователей данного микроорганизма, дополняется участвовавшими случаями резистентности *Candida* spp. к современным противогрибковым препаратам. Высокие показатели заболеваемости и значительные расходы систем здравоохранения, обусловленные смертностью и затратами на лечение кандидоза, явились предпосылками для масштабных исследовательских проектов по изучению заболевания и его возбудителей, в том числе — геномики *C. albicans*.

Проект секвенирования генома *C. albicans* был начат в 1996 г. в Стэнфордском геномном техническом центре (США). Для получения дробных последовательностей всего генома был исполь-

зован штамм SC5314. В 1998 г. было получено 1,5-кратное покрытие гаплоидного генома (16 млн. н. п.); впоследствии секвенирование достигло 10,4-кратного покрытия, которое используется в текущих сборках. Полученные последовательности носят номер версии сборки и собственный номер. Всего было собрано 1213 последовательностей с размером более 2 кб, самая крупная из них — 282 тыс. н. п., общим размером 17,4 млн н. п. (6-я сборка). Это превышает размер гаплоидного генома из-за того, что отдельные сборки содержат гетерозиготные участки (*Candida albicans* — диплоид). Трансляция последовательностей выявила наличие 9168 ОРС, кодирующих белки из 100 аминокислот и более.

Митохондриальная ДНК не вошла в общее число собранных последовательностей. Проблемы сборки заключались в диплоидной природе *C. albicans*, что приводило к высокой степени фрагментации. К настоящему времени эти проблемы в целом решены. Последняя, 19-я сборка, представляет усовершенствованную реконструкцию диплоидного генома *C. albicans*.

Информация и базы данных последовательностей в настоящее время находятся на сервере проекта (Интернет: <http://www.sequence-stanford.edu/goup/candida>).

Постгеномные исследования предусматривают изучение функции продуктов выделенных генов из уже доступных целиком геномов. Для этого необходимы анализ генома, аннотация и последовательное или целевое изучение его составляющих.

С целью изучения функции белков *C. albicans* и их значения как факторов вирулентности и взаимодействия с организмом человека на генетическом уровне (профилирование транскриптов, методы гибридизации кодирующих генов) проводится анализ выделенного генома. Для этого создана специальная база данных (CandidaDB), в рамках которой анализируются выделенные в 6-й сборке последовательности генома *C. albicans*. В качестве мишеней для изучения выбраны ОРС, кодирующие белки из не менее 150 аминокислот, или имеющие гомологи в других базах данных, или отличающиеся высокой кодирующей вероятностью, рассчитанной по методу GeneMark. Идентификации подлежат также дублирующиеся в гетерозиготном состоянии последовательности, кодирующие белки. Одной из основных задач проекта CandidaDB является аннотация всех ОРС *Candida albicans*. В настоящее время база данных содержит 6165 неповторяющихся записей, что соответствует примерно 5920 генам *C. albicans*. CandidaDB обеспечивается также информацией, содержащейся в других генетических базах и источниках данных (Genbank, EMBL и др.). Часть информации получают и применяют для аннотации, используя гомологичные гены *S. cerevisiae* и их продукты. Таким образом, цель проекта — анализ генома *C. albicans* средствами биоинформати-

ки и предоставление результатов для дальнейших исследований и их интеграция по мере накопления сведений о функции продуктов изучаемых генов.

И до окончания масштабных международных проектов по изучению генома *Candida albicans* многие гены и их продукты были уже известны. К настоящему времени геном *C. albicans* во многом охарактеризован.

Диплоидность *C. albicans* была предположена A. F. Olaiya и S. J. Sogin в 1979 г., а доказана в 1980 г. W. L. Whelan, R. M. Partridge и P. T. Magee, обнаружившим гетерозиготные штаммы; позднее она была подтверждена и другими исследователями. Благодаря близости между геномами *C. albicans* и *S. cerevisiae* у первого был обнаружен локус типа спаривания. Несмотря на то что мейоз до настоящего времени не удалось получить, найдены многие близкие гомологам у *S. cerevisiae* гены, необходимые для мейоза и рекомбинации *C. albicans*.

По оценочным данным, всего в гаплоидном наборе *C. albicans* имеется около 6500 генов, из них 25—30 % не имеют соответствия в базе генома *S. cerevisiae*. Большинство полученных генов *C. albicans* не содержат интронов. Основная часть генов находится в ядерном геноме и всего $40 \cdot 10^3$ пар оснований — в кольцевых хромосомах митохондрий. В ядре генетический материал содержится в 8 хромосомах. Семь хромосом нумеруются по размеру, начиная с большей. Восьмая хромосома, содержащая в основном рибосомальную ДНК, имеет переменную величину. Эта хромосома, не имеющая номера, называется R-хромосомой. Генотипическая изменчивость на хромосомном уровне чаще всего заключается в изменении размера R-хромосомы, реже — в транслокациях, фрагментации отдельных хромосом, анеуплоидии.

Карты генома и хромосом *C. albicans*, а также аннотации многих генов и сопутствующая информация доступны в Интернете: <http://alces.med.umn.edu/candida>.

Важная часть стратегии постгеномных исследований *C. albicans* предусматривает изучение функции значимых генов, не имеющих аналогов в уже аннотированном геноме *S. cerevisiae* как непатогенных дрожжей, или близких генам других видов грибов. Предполагается, что эти гены могут иметь значение в патогенезе кандидоза. Сегодня число таких генов приближается к 600. В настоящее время установлены различия *C. albicans* и *S. cerevisiae* в наборе генов и их продуктов, отвечающих за различные стадии метаболизма белков и липидов, регуляции клеточного цикла, и др. Методы сравнительной геномики, задействованные в изучении возбудителей кандидоза, включают также сопоставление генов разных представителей рода *Candida*. В то время как *C. albicans* можно считать наиболее патогенным и адаптированным к мак-

роорганизму видом *Candida*. другие виды обуславливают существенную часть заболеваемости инвазивным и диссеминированным кандидозом, имеют особенности эпидемиологии и, что особенно важно, зачастую демонстрируют иные профили чувствительности и устойчивость к существующим противогрибковым средствам. Считается, что эволюционная дивергенция между отдельными возбудителями кандидоза может достигать 300 млн лет. Кроме *C. albicans* диплоидными являются также *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* и некоторые другие виды. Среди представителей рода есть и грибы с гаплоидным набором хромосом, например *C. glabrata* и *C. guilliermondii*.

В настоящее время организованы и проводятся проекты изучения геномов *C. glabrata* (Франция), *C. tropicalis* (отдельно США и Франция/Германия), а также *Candida (Clavispora) lusitaniae* и *Candida (Pichia) guilliermondii* (США). От сопоставления близкородственных и более далеких видов *Candida* (*C. albicans* и *C. tropicalis*, *C. albicans* и *C. lusitaniae*) надеются получить сведения о консервации белков и выделить общие факторы, имеющие значение для вирулентности или адаптации. Кроме того, это сможет раскрыть причины устойчивости отдельных видов *Candida* к ряду антимикотиков, например *C. lusitaniae* — к амфотерицину В. Полезным может оказаться сопоставление диплоидных геномов *C. albicans* и *C. tropicalis* с близкородственным, но гаплоидным геномом *C. guilliermondii*.

Исследования генома *Aspergillus fumigatus*

Интерес к изучению геномов *Aspergillus* spp. обусловлен заметной ролью этих грибов в этиологии оппортунистических инвазивных микозов с высокой смертностью, в свою очередь отражающей их широкое распространение в окружающей среде. Различные формы аспергиллеза, вызываемые прежде всего *A. fumigatus*, *A. flavus* и рядом других видов, дополняются токсигенным и аллергенным потенциалом многих представителей рода. Все эти свойства *Aspergillus* spp. были признаны достаточными для изучения геномов *A. fumigatus* и в ближайшей перспективе — других видов. Наличие хорошо изученного непатогенного вида *A. nidulans* с известным половым циклом развития и уже аннотированным геномом предполагало возможность сопоставления генетического материала и выделения факторов вирулентности, специфичных как для *Aspergillus* spp., так и в целом для условно-патогенных возбудителей других плесневых микозов.

Проекты изучения генома *Aspergillus* spp. были начаты разными исследовательскими коллективами и организациями из ряда европейских стран и США в 2000 — 2001 гг. Для исследований был

использован клинический штамм Af293. После разработки общей стратегии секвенирования, включавшей использование искусственных бактериальных хромосом (BAC) и дробное секвенирование генома, центры в Великобритании (Институт Сангера) и США (Институт геномных исследований) приступили к реализации проекта, предусматривавшего создание BAC-библиотек, создания физической карты и секвенирования 10 связанных BAC-клонов, а затем — WGS-секвенирования.

К настоящему времени секвенирование генома *A. fumigatus* в целом завершено, однако доступные для аннотации и используемые материалы рассматриваются как предварительные. Удалось получить 10-кратное покрытие генома *A. fumigatus*. Общий размер последовательностей, полученных совместными усилиями двух центров, составил 28,6 млн н.п. Сюда входит 9744 генов, в том числе около 4300 функциональных. Кодирующая часть секвенированного генома *A. fumigatus* составляет 49,1 %, средняя длина гена — 1,4 тыс. н.п. Плотность генов оценена как 1 на каждые 3 тыс. н.п. выделенных последовательностей. Более 75 % генов имеют интроны в среднем по 2,7 с размером 122.

Данные доступны в Интернете: <http://www.tigr.org/tdb/c2kl/afu1>. Общий размер генома *A. fumigatus* оценивался также как 32 или 35 млн н.п.

Для анализа результатов секвенирования, аннотации и дальнейшего изучения генома *A. fumigatus* и других видов (*A. nidulans*) создана система CADRE (центральный репозиторий данных по *Aspergillus*). В настоящее время пройдено тестирование данной системы на основе имеющихся результатов секвенирования *A. fumigatus*, полученных английскими исследователями, собравшими 922 тыс. н.п. последовательностей к концу 2003 г. на основе 16 BAC-клонов. Всего в данной сборке предполагается наличие 341 гена.

Многие гены *A. fumigatus* были аннотированы ранее, еще до завершения основных работ по секвенированию всего генома; сведения содержатся в нескольких общедоступных базах данных.

Перечень всех аннотированных к началу 2001 г. генов *A. fumigatus* соответственно их функциям доступен в Интернет на сайте, посвященном *Aspergillus*, по адресу: <http://www.aspergillus.man.ac.uk>.

В различной степени реализации находятся проекты изучения других видов *Aspergillus*, в частности *A. flavus* (США). Секвенирование этого генома (штамм NRRL3357) будет вестись до 6-кратного покрытия. Секвенируются или уже получены геномы *A. nidulans* (разные проекты, размер генома около 31 млн. н.п.), а также *A. niger* (один из проектов завершен, размер генома 34,5 млн н.п. или 14000 ОРС), *A. parasiticus* (США), *A. terreus* и *A. oryzae* (США). Завершение текущих геномных проектов разных видов

Aspergillus и их аннотация позволят охарактеризовать и сопоставить гены, имеющие значение в патогенезе обусловленных аспергиллами заболеваний. Как и в случае с разными *Candida* spp., исследователи надеются оценить степень консервации различных генов (например, сопоставляя *A. fumigatus*, *A. niger* и *A. nidulans*) и кодируемых ими функций, в частности образование различных метаболитов.

Исследования генома *Cryptococcus neoformans*

Cryptococcus neoformans — возбудитель криптококкоза, оппортунистической и СПИД-ассоциированной инфекции, проявляющейся криптококковым менингитом — заболеванием с высокой вероятностью летального исхода и необходимостью длительной, нередко пожизненной поддерживающей терапии, сопровождающейся риском устойчивости. Для изучения *C. neoformans* были начаты разные геномные проекты. Американские исследовательские коллективы начали секвенирование геномов трех штаммов *C. neoformans*: серотипов А (штамм H99) и D (штаммы JEC21 и B3501), а канадские — секвенирование австралийского штамма *C. neoformans* var. *gattii* (серотип В, штамм WM276).

Проект секвенирования генома *C. neoformans* (штамм JEC21) проводится Институтом геномных исследований США (TIGR) с целью дополнить аналогичный проект Стэнфордского института и обеспечить дополнительное 4-кратное покрытие генома. К настоящему времени в данном проекте достигнуто 10,5-кратное покрытие; имеющиеся разрывы последовательностей постепенно удаляются. Собраны последовательности для 3 завершенных хромосом (2, 7 и 9). В задачи данного проекта входит также интеграция всех доступных данных секвенирования и автоматическая аннотация генома *C. neoformans* по мере поступления данных уже создана физическая карта.

Информация о проекте и данные доступны в Интернете: <http://www.tigr.org/tdb/c2k1/cna1>. Полная реализация проекта, по заявлению разработчиков, предоставит исследователям первый открытый геном базидиомицетов, который мог бы послужить моделью для изучения и других организмов.

Проект секвенирования генома *C. neoformans* Стэнфордского центра геномных технологий был начат в 2000 г. и к середине 2001 г. было завершено WGS-секвенирование, обеспечившее 7-кратное покрытие. Для секвенирования использовался штамм B-3501A. Затем усилия исследователей были объединены с разработчиками из TIGR, вместе достигшими 12—13-кратного покрытия. В последних сборках постепенно ликвидируются существовавшие разрывы имеющихся последовательностей. Полученные ма-

териалы группируются, чтобы отразить распределение по 14 хромосомам *C. neoformans*.

Информация доступна в Интернете: <http://www-sequence.stanford.edu/group/C.neoformans/>.

Секвенирование генома *C. neoformans* var. *grubii* (серотип А; штамм Н99) организовано американским центром геномных технологий Университета Дюка. В разных центрах получены плазмидные и ВАС-последовательности, обеспечившие 10-кратное покрытие генома, размер которого оценивается в 19,5 млн. н. п. В настоящее время проводятся работы по ликвидации остающихся разрывов последовательностей. Интерес исследователей данного проекта привлекают, в частности, изменчивость и разнообразие представителей *C. neoformans*, сопоставление разных вариантов и серотипов как возбудителей инфекций, имеющих важные эпидемиологические и клинические различия. Оценка степени эволюционной дивергенции разных серотипов указывает на возраст более 40 млн лет.

C. neoformans var. *gattii* (серотипы В и С) с эндемичной зоной в Австралии вызвали вспышку криптококкоза у иммунокомпетентных лиц в Канаде, что привело к нескольким смертельным исходам. Проект секвенирования генома природного штамма *C. neoformans* var. *gattii* WM276, родственного возбудителю вспышки, проводимый канадскими исследователями, в настоящее время вышел на уровень 5-кратного покрытия генома. Существенные различия, в частности, в генотипе и способности к спариванию, выявленные между возбудителем вспышки и стерильными природными изолятами, вызывают повышенный интерес исследователей. Большинство изолятов *C. neoformans* гаплоидны, размер генома оценивался ранее как 24 млн. н. п. с 12 хромосомами. Наличие полового цикла развития с типами МАТ α и МАТ α позволяет применять классические генетические методы в исследованиях данного вида.

Перспективы постгеномных исследований

По мере того как становятся общедоступными данные о геномах возбудителей микозов, исследователи приближаются к открытиям отдельных факторов вирулентности, хотя патогенез грибковых заболеваний представляется заведомо многофакторным. Текущее состояние крупных генетических, а вернее геномных исследований, можно назвать именно введением в генетику грибов, имеющих значение для медицины, мостом к генетическим исследованиям ближайшего будущего. Вместе с тем в настоящее время уже существует достаточно большое число молекулярных

методов для манипуляций с генами множества болезнетворных грибов. Они успешно использовались и используются во многих генетических исследованиях догеномной эпохи. Разные методы генетических изменений, направленные на внедрение нового генетического материала, были созданы для *C. albicans* еще в 1986 г. и позднее разработаны для разных *Candida* spp., *C. neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis* и ряда других возбудителей.

Необходимость выделения генов для их идентификации сохраняется и после получения целых геномов. В частности, функции ряда генов *C. albicans* могут быть исследованы сравнением с *S. cerevisiae*; с использованием подобных подходов были клонированы некоторые детерминанты филаментации и адгезии дрожжей. В настоящее время созданы эффективные методы удаления генов *C. albicans* для преодоления проблем, связанных с диплоидностью данного организма. С целью изучения экспрессии на уровне генома применяют микромассивы ДНК, в частности для *C. albicans* и *H. capsulatum*. Для разных видов патогенных и условно-патогенных грибов используются разные системы репортеров и регуляторов экспрессии генов.

Исследования патогенеза и вирулентности ряда условно-патогенных грибов на основе получаемых геномов ведутся уже сегодня, хотя доступны и в перспективе будут доступны геномы только их отдельных штаммов. Общая тактика текущих исследований может быть охарактеризована как, во-первых, выделение и оценка генов, не обнаруженных у родственных непатогенных грибов, и, во-вторых, изучение тех генов, которые экспрессируются только во время инфекции. Прицельно разрушая те или иные гены, можно оценить важность кодируемых ими предполагаемых факторов патогенности, например литических ферментов. Возможно также определение транскрипционного профиля и экспрессии ряда генов *in vivo*, в ходе экспериментальной инфекции или взаимодействия с некоторыми клетками макроорганизма (например, макрофагами).

Для выбора действительных генетических детерминант патогенности из нескольких возможных используют разные штаммы-мутанты, полученные с помощью инсерционного мутагенеза и рекомбинантных ДНК, вводя их в организм лабораторных животных. После этого оценивают, какие именно мутанты выжили, т.е. с наличием каких именно генов можно ассоциировать способность вызывать инфекцию, или как отличается вирулентность разных мутантов. Важным является исключение из списка потенциальных генов вирулентности «домашних» генов и кодирующих жизненно необходимые метаболические процессы. Для изучения вирулентности грибов представляют интерес как гены, продукты которых непосредственно взаимодействуют с тканями макро-

организма, так и регуляторы генов, экспрессируемых во время инфекции.

Генетика патогенности возбудителей микозов

Изучение патогенных свойств и вирулентности возбудителей микозов ведется уже много лет. Наибольшее внимание обычно уделялось тем же грибам, для которых проводятся или запланированы геномные проекты. Общие вопросы, ответы на которые пытаются найти исследователи вирулентности и патогенеза, можно сформулировать так:

- 1) каковы наиболее общие факторы агрессии возбудителей микозов?
- 2) что делает патогенными конкретные грибы?
- 3) как осуществляется регуляция факторов патогенности?

Эти вопросы можно охарактеризовать более подробно, коснувшись клинически значимых проблем патогенеза грибковых инфекций. Говоря о наиболее общих факторах агрессии, можно вспомнить то множество широко распространенных в природе плесневых грибов (от представителей *Mucogales* до *Aspergillus* spp.), которые вызывают тяжелые формы инвазивных микозов у больных с нейтропенией и недеиствующим фагоцитозом. При этом необходимо знать те минимальные требования, которые требуются для роста этих грибов в тканях человека и возможности противостояния грибам естественным факторам резистентности. Молекулярно-генетические подходы к изучению указанных факторов могут заключаться в поиске у определенных видов условно-патогенных генов, аналогичных кодирующим, уже известных факторов патогенности, описанных у других грибов. Исходный поиск «генов патогенности», как уже говорилось выше, можно проводить по различиям в геномах между родственными, патогенными и непатогенными грибами. Интерес к вирулентности конкретных возбудителей может рассматриваться особо для таких важных групп, как дерматофиты, *Candida* spp., *C. neoformans*, диморфные грибы. Почему дерматофитии контагиозны и широко распространены, а дерматофиты разрушают роговые ткани и не могут расти глубже эпидермиса? Что обуславливает СПИД-ассоциированную природу криптококкоза и американских респираторных микозов, массовую инфицированность населения эндемических районов? За счет каких средств адаптации *C. albicans* так распространено носительство данного вида на слизистых оболочках? Почему и при каких обстоятельствах из кандидной колонизации развивается кандидоз? Именно в отношении кандидоза очень важен вопрос о регуляции факторов патогенности. Необходимо выявить те элементы состояния макроорганизма человека,

которые могут определять начальные стадии развития кандидоза. Ответы на эти вопросы были получены без использования молекулярно-генетических методов.

Генетические детерминанты патогенности возбудителей микозов

До эпохи молекулярно-генетических исследований были описаны многие факторы патогенности, например литические ферменты разных грибов, адгезины *C. albicans* или капсула *C. neoformans*. Генетические исследования позволили оценить значение некоторых из уже доказанных или предполагаемых факторов патогенности, найти их генетические детерминанты, а в ряде случаев изучить регуляцию их экспрессии в ходе инфекции. Исследования по принципам «от признака к гену» проводились в догеномную эпоху и продолжают в настоящее время, переходя на геномный уровень. Так, сегодня известны гены, кодирующие секретируемые аспартилпротеиназы *C. albicans* (SAP), известны и хромосомы, на которых они располагаются (табл. 40).

Дальнейшие исследования рассматривают или могут рассматривать сравнительную экспрессию этих генов при разных формах инфекции, регуляцию их экспрессии в зависимости от условий среды и ее ассоциацию с экспрессией других факторов.

Протеиназы *C. albicans* изучены наиболее полно. Кислые аспартил-протеиназы (известно 10 изоферментов) представляют собой белки размером 32—58 кДа. Субстратами для протеиназ *C. albicans* могут служить многие белки организма человека: кератин, белки эндотелия и базальных мембран, в том числе коллаген, ламинин, фибронектин и эндотелин-1, Fc-фрагменты иммуноглобулина G, фракция C3 комплемента, сывороточный альбумин и другие белки плазмы крови. Активность протеиназ обеспечивает

Таблица 40. Некоторые гены, кодирующие
предполагаемые факторы патогенности *C. albicans*

Хромосома	Гены	Белок/функция
1	SAP7	Протеиназа
	CAT1	Каталаза
3	AAF1 (ADF1)	Адгезия
	SAP3, SAP8, SAP9	Протеиназы
	PHR1	Адаптация к изменениям pH
6	SAP1, SAP4, SAP5, SAP6	Протеиназы
R	SAP2	Протеиназа

адгезию и пенетрацию *C. albicans* через слизистые оболочки, проникновение в глубже лежащие ткани. Протеиназы были обнаружены внутри макрофагов, фагоцитировавших клетки *C. albicans*. Это предполагает сопротивление фагоцитозу за счет взаимодействия с внутриклеточными компонентами окислительных защитных систем. Кроме того, деятельность протеиназ может затрагивать белковые каскады киноген-кина, комплемента, фибринолиза, арахидоновой кислоты, тем самым нарушая регуляцию иммунитета и воспалительных процессов. Допускается опосредованное участие протеиназ в модуляции иммунитета через маннопротеины клеточной стенки. К самим протеиназам в организме человека и лабораторных животных вырабатываются антитела.

Изучение сравнительной экспрессии SAP-протеиназ *C. albicans* проводилось с привлечением разных молекулярно-генетических методов, включая блоттинг, ПЦР с обратной транскриптазой, системы репортеров экспрессии, создание мутантов по кодирующим генам SAP и др. Было установлено, что разные SAP-гены экспрессируются штаммами, выделенными от больных кандидозом полости рта. Различные гены SAP экспрессировались последовательно в модели кандидоза полости рта. С помощью штаммов-мутантов Δsap 1,3 и Δsap 4,5,6 было установлено, что гены, кодирующие 1- и 3-протеиназы, имели наибольшее значение для вирулентности. На модели вагинального кандидоза была показана важная роль экспрессии SAP 2 для патогенеза в данной локализации. В то же время мРНК SAP 4—6 обнаруживаются при стимуляции гиф *C. albicans* сывороткой крови, что может иметь значение в патогенезе глубоких форм кандидоза. Это подтверждается результатами опытов с Δsap 4, 5, 6-мутантами. Было сделано предположение, что экспрессия SAP 4, 5 и 6 происходит под влиянием каких-то макрофагальных медиаторов посредством фактора транскрипции CaTef1p, распознающего повторяющиеся последовательности промоторов.

Адгезия *Candida spp.* к тканям считается начальным звеном в цепи событий, приводящих к развитию кандидоза. В связи с этим проводились многочисленные исследования механизмов адгезии и проводилось сопоставление их с вирулентностью *Candida spp.* С тех пор, как стало возможным измерять степень адгезии, установлена четкая корреляция между способностью гриба к адгезии и его вирулентностью в эксперименте. У *Candida spp.* адгезины представлены маннопротеинами клеточной стенки. Мутанты *C. albicans*, лишенные гена MNT1, кодирующего маннозилтрансферазу, отличаются меньшей степенью адгезии к эпителиоцитам полости рта. Вирулентность таких мутантов существенно снижена, что установлено на моделях вагинального и системного кандидоза. Описаны рецепторы *C. albicans*, связывающиеся с макро-

молекулами основных мембран, внесклеточного матрикса, а также белками плазмы крови.

Генетические исследования позволили уточнить имевшиеся ранее данные об адгезинах *C. albicans*, механизмах и субстратах специфической адгезии. Клонированы гены (EPA1), кодирующие лектиновые белки у *C. glabrata*; их делеция на 95 % снижает степень адгезии к клеткам эпителия. Гетерологичная экспрессия этих генов у не адгезирующих штаммов *S. cerevisiae* сообщает им способность к адгезии. Продукты генов семейства ALS (агглютинин-подобные последовательности), общие для *Candida* и *Saccharomyces*, обнаружены в тканях на модели диссеминированного кандидоза. Найден ген HWP1, кодирующий протейн стенки гифы *C. albicans*. Его продукт служит субстратом для трансклутаминаз эпителиоцитов, после взаимодействия с которыми образуются ковалентные связи между оболочкой гриба и поверхностью эпителия человека.

Гены, кодирующие интегринподобные молекулы дрожжей (INT1), клонированы у *C. albicans*, а их продукты, гомологичные α M-цепи рецептора iC3b у человека, найдены только у этого возбудителя. Рецепторы C3d и iC3b фракций комплемента проявляют сходство с β_2 -интегринами человека, несущими ту же функцию, а именно с рецепторами CR2, CR3 и CR4 (или CD11c и CD21), расположенными на нейтрофилах, макрофагах, В-лимфоцитах и NK клетках. Аналогичные рецепторы у человека обеспечивают адгезию клеток иммунной системы к эндотелию. Рецептор к C3d способствует адгезии грибов к белкам межклеточного матрикса, а похожий на CR3 рецептор — к эндотелию. Наличие у *Candida spp.* рецепторов, похожих на рецепторы макроорганизма, имеет значение не только для адгезии грибов к тканям, но и для распознавания грибов клетками человека. Так, например, рецепторы к комплементарному фактору iC3b, являющемуся опсо-нином, могут способствовать адгезии грибов к опсонизированным этим фактором эритроцитам. Далее может происходить гемолиз эритроцитов с высвобождением из гема железа, необходимого для роста грибов. Вместе с тем, у нейтрофилов человека тоже имеется рецептор iC3b (CR3). Клетки гриба, покрытые iC3b, становятся легкодоступными фагоцитозу, но с помощью собственного рецептора грибковая клетка закрывает центр связывания iC3b, затрудняя фагоцитоз.

Направления исследований «от гена к признаку» позволяют выделить новые факторы патогенности, если экспрессия новых, проверяемых или только искомым генов обнаруживается в экспериментальной модели инфекции. Данный подход, в частности, был применен для поиска генов, кодирующих факторы, позволяющие выживать внутри макрофагов возбудителю гистоплазмоза — эндемического респираторного СПИД-ассоциированного

микоза, одной из классических оппортунистических инфекций с внутриклеточной персистенцией возбудителя. Метод полимеразной цепной реакции с использованием обратной транскриптазы был использован для поиска генов *Histoplasma capsulatum*, экспрессирующихся при взаимодействии с макрофагами. Были найдены несколько мРНК с повышенной и пониженной экспрессией, и только для одной из последовательностей были найдены соответствия в геномах других организмов и установлен продукт ее трансляции. Для проверки значения предполагаемого фактора вирулентности можно не только оценить экспрессию его генетических детерминант в ходе инфекции или ее модели, но и создать штаммы-мутанты, где эти детерминанты будут отсутствовать. Так, «лишив» *H. capsulatum* гена СВР1, кодирующего кальцийсвязывающий белок, который обнаруживается только в дрожжевых (внутриклеточных) формах этого диморфного гриба, удалось получить штамм, неспособный разрушать клетки макрофагов *in vitro* и в целом слабовирулентный *in vivo*.

Подобные методы позволили также подтвердить патогенетическое значение генов, связанных с образованием капсулы *C. neoformans*. Наличие полисахаридной капсулы напрямую связывают с патогенностью *C. neoformans*. Бескапсульные и слабоинкапсулированные штаммы менее вирулентны и вызывают легкие формы инфекции. Роль капсулы *C. neoformans* рассматривается прежде всего как защита оболочки от влияния факторов резистентности макроорганизма.

В качестве одного из главных факторов патогенности *C. neoformans* в настоящее время рассматривается способность к образованию меланина. Эта способность связана с фенолоксидазной активностью, т.е. наличием ферментов, позволяющих синтезировать меланиноподобные вещества из ДОПА и других субстратов с диgidроксифенолом. Такими субстратами, в частности, богат головной мозг. Значение меланинов как факторов патогенности предполагается в обеспечиваемой ими повышенной устойчивости к действию фагоцитарных перекисных радикалов и вообще окислителей. Таким образом, за счет использования катехоламинов макроорганизма и меланизации своей оболочки клетка *C. neoformans* сопротивляется окислительному повреждению продуктами кислорода и оксида азота.

В настоящее время клонирован ген *CNLAC1*, кодирующий фермент дифенолоксидазу *C. neoformans* с массой 75 кДа. Удаление этого гена приводит к утрате вирулентности. Транскрипты данного гена с помощью полимеразно-цепной реакции обнаруживают и в ликворе зараженных лабораторных животных.

Обобщая накопленный опыт молекулярно-генетических исследований патогенности возбудителей грибковых инфекций, можно констатировать, что для некоторых из ранее известных фак-

торов патогенности были найдены кодирующие их гены, и в отдельных случаях удалось подтвердить или опровергнуть значение участия данных факторов в патогенезе микозов на генетическом уровне. Было выделено несколько новых генов, экспрессия которых отмечается в ходе инфекции или приводит к большей вирулентности гриба-возбудителя; охарактеризованы их продукты. По мере завершения новых геномных проектов число таких генов и соответственно число потенциальных факторов патогенности будет увеличиваться. В то же время, даже располагая сведениями о многих доказанных факторах патогенности, трудно составить картину патогенеза и общего «поведения» возбудителей в ходе инфекции. При этом следует делать поправки на наличие разных форм и стадий инфекции, вызванных теми же возбудителями, разницу в изучаемых штаммах грибов и отличия между моделями инфекции — разными лабораторными животными и условиями макроорганизма человека. Предполагая патогенез микозов заведомо комплексным с многофакторной, поливалентной вирулентностью возбудителей, современные исследователи оговаривают необходимость многих дальнейших работ.

Генетика грибов и регуляция патогенности

О механизмах регуляции факторов патогенности у возбудителей микозов по-прежнему известно очень мало. Основной вопрос в приложении к конкретным патогенным или условно-патогенным грибам может быть сформулирован так: отчего и как происходят те комплексные изменения фенотипа возбудителя, которые проявляются, с одной стороны, образованием факторов агрессии, а с другой — адаптацией к условиям макроорганизма человека. Сложность данного вопроса обуславливает необходимость многочисленных исследований, посвященных отдельным молекулам и процессам взаимодействия гриба и макроорганизма.

Молекулярно-генетические исследования формулируют данный вопрос более конкретно: как происходит регуляция экспрессии генов, связанных с патогенностью грибов? Варианты решения могут быть разными. Во-первых, можно изучить, как (с привлечением каких механизмов) осуществляется регуляция экспрессии генов уже найденных и доказанных факторов патогенности (литических ферментов, адгезинов и пр.). Во-вторых, можно проследить активность известных грибных систем регуляции (сигнальные системы, каскады) в ходе инфекции.

Основная погрешность этих и всех существующих сегодня подходов к изучению генетической регуляции патогенности состоит в том, что известные общие механизмы регуляции определяют не только экспрессию факторов патогенности, но и общие фи-

физиологические процессы в грибной клетке: обмен веществ, морфогенез, половой цикл развития и др. В частности, гомологи известного регуляторного гена *STE12* у *S. cerevisiae*, задействованного в процессах спаривания (см. с. 173), у *C. neoformans* ассоциируются с регуляцией образования капсулы и меланизации, а у *C. albicans*, по-видимому, вообще не связан с каким-либо фактором патогенности.

Выделить механизмы, регулирующие экспрессию только факторов патогенности, едва ли представляется возможным. Так, ослабленная вирулентность штаммов-мутантов, лишенных тех или иных регуляторных генов, может быть обусловлена не сокращением экспрессии какого-то фактора патогенности, а общим снижением жизнеспособности.

У *C. albicans* изучены разные аспекты регуляции экспрессии генов, связанных с таким общим процессом, как морфогенез. Аналогом транскрипционного фактора *STE12* *S. cerevisiae*, опосредующего переход от бластоконидий к псевдомицелию, у *C. albicans* является *CPH1*. Этот фактор регулируется МАП-киназным каскадом. В его состав входят киназы *CST20* (гомолог *STE20*), *HST7* (гомолог *STE 7*) и *CEK1* (гомолог *FUS3* и *KSS1*) (рис. 86).

Нуль-мутации любого из этих генов или самого *CPH1* приводят к ухудшению образования гиф на твердой среде, однако в присутствии сыворотки такие эффекты не отмечены. В то же время мутанты *cek1* имеют незначительные дефекты роста и меньшую вирулентность. Подобные находки могут свидетельствовать о том, что регуляторные каскады на разных уровнях могут быть связаны с разными процессами, в том числе — с опосредующими вирулентность. Ослабление вирулентности отмечено также для мутантов *cst20*, но не для *hst7* или *cph1*. Фосфатаза МАП-киназы *CPH1* также ассоциируется с образованием мицелия *C. albicans*, а штаммы, лишенные обоих аллелей *cpr1*, отличаются гиперфиламентацией и ослабленной вирулентностью.

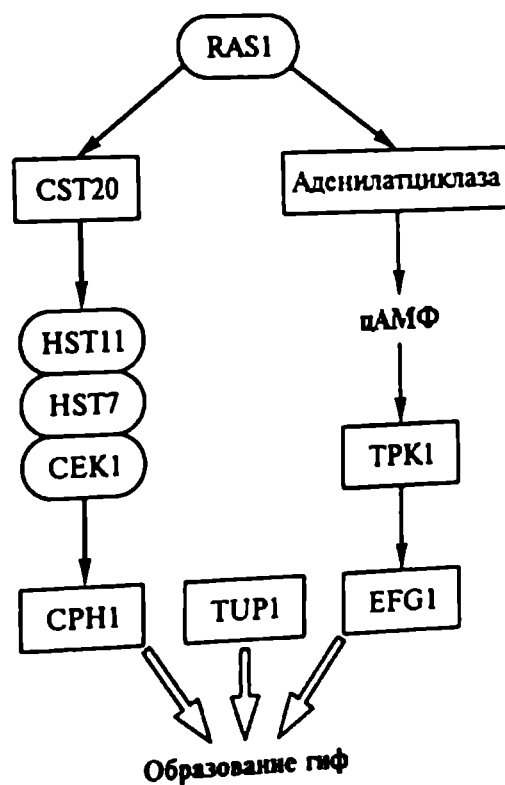


Рис. 86. Сигнальные системы, ассоциированные с морфогенезом и вирулентностью *C. albicans* (K. B. Lengler et al., 2000)

В регуляции морфогенеза *C. albicans* принимает участие и другой фактор транскрипции — EFG1. Это белок-гомолог PHD1 у *S. cerevisiae*. Избыточная экспрессия его гена приводит к филаментации *C. albicans*, а мутанты *efg1/efg1* отличаются сниженной способностью к образованию гиф, и при взаимодействии с сывороткой дают не истинные гифы, а псевдогифы. Мутанты сразу по двум генам — *cph1/cph1* и *efg1/efg1* — отличаются более тяжелыми дефектами филаментации (образования гиф) и являются вполне авирулентными. Это одно из свидетельств в пользу взаимосвязи регуляции морфогенеза и вирулентности.

Другим механизмом регуляции морфогенеза *C. albicans* является ПКА-зависимый путь (рис. 86). Установлено, что образование гиф сопровождается повышением концентрации цАМФ; подавление цАМФ фосфодиэстеразы активизирует филаментацию, а ингибиторы протеинкиназ подавляют рост гиф. Ген протеинкиназы TRK1 экспрессируется при образовании мицелиальных форм, а мутанты *tpk1/tpk1* отличаются меньшей способностью к филаментации. При этом филаментация таких мутантов восстанавливается при усиленной экспрессии CEK1 или EFG1, а экспрессия TRK2 нивелирует дефекты филаментации мутантов *cek1/cek1*, но не *efg1/efg1*. По-видимому, транскрипционный фактор EFG1 в регуляторной цепи расположен ниже уровня цАМФ. Фактор TRK1 может считаться одним из основных звеньев регуляции морфогенеза *C. albicans*. Мутации его гомологов у *S. cerevisiae* оказывают существенно менее значительное влияние на филаментацию.

Еще одним регулятором филаментации *C. albicans* является фактор RAS1, который находится на уровне выше МАП-киназного и цАМФ-зависимого путей. Мутанты *ras1/ras1* отличаются такой же сниженной способностью к филаментации, как *cph1/cph1* и *efg1/efg1*. Среди известных факторов генетической регуляции TUP1 гомолог общего репрессора транскрипции *S. cerevisiae* также принимает участие в регуляции морфогенеза, но, по-видимому, независимо от МАП-киназы или протеинкиназ. Гены, экспрессия которых регулируется данными факторами (HWP1, ECE1 и др.), напрямую связаны со способностью к образованию гиф или псевдогиф.

Предполагается, что существуют и другие пути регуляции морфогенеза, поскольку мутанты по всем перечисленным генам сохраняют способность к филаментации при определенных условиях. При этом ослабление вирулентности отмечается не только при подавлении филаментации, но и при усилении активности данных регуляторных путей и гиперфиламентации. Это может свидетельствовать о том, что для развития кандидоза важно существование как дрожжевых, так и мицелиальных форм возбудителя, и их своевременное чередование.

Каким образом полиморфизм *Candida* spp. отражается на их патогенности? В мицелиальной и дрожжевой фазах грибы адапти-

рованы к разным условиям среды. Применительно к организму человека можно заметить, что в разных фазах *C. albicans* выживает при температуре крови и на более холодных наружных покровах, в кислых средах кожи, влагалища, верхних отделов кишечника, и в более щелочных средах крови и тканей, вместе с анаэробной флорой толстой кишки и на открытых поверхностях тела. Переход в мицелиальную фазу обеспечивает более эффективную абсорбцию питательных веществ, что дает колонии выжить при недостатке источников углерода и азота. Переход в дрожжевую фазу при благоприятных условиях обеспечивает интенсивный рост колонии за счет быстрого размножения почкованием.

Параметры внутренней среды организма человека, т.е. температура 37°C и $\text{pH} > 6,5$, довольно бедное свободными питательными веществами и вообще неблагоприятное окружение располагают к росту псевдогиф и настоящего мицелия. Таким образом, немалое и, по-видимому, главное преимущество мицелиальной фазы *Candida* spp. — адаптация к естественным условиям макроорганизма.

В отношении собственно патогенных свойств псевдогифы и гифы также имеют преимущество перед дрожжевыми клетками. Большая длина клетки означает не только большую площадь абсорбции питательных веществ, но и большую поверхность для адгезии. Рост новых клеток — единственная форма движения гриба. В настоящем мицелии рост новых клеток строго апикальный, а у псевдогиф также с поляризацией на одном конце клетки. Равномерному мультиполярному росту в дрожжевой фазе противопоставит направленный, с концентрацией у верхушки, рост мицелиальной фазы. При инвазии, т.е. движении гриба в ткани макроорганизма, создается концентрация давления на ограниченном участке. Кроме того, апикальное распределение метаболических процессов допускает и наибольшую активность литических ферментов у верхушки.

С переходом из одной фазы роста в другую изменяется строение клеточной стенки. Применительно к ее внешним слоям можно предположить, что с их изменением изменяются адгезивные и антигенные свойства клетки, а следовательно, и ассоциированные с оболочкой факторы вирулентности. Одна из выгод роста гриба в мицелиальной фазе заключается, в частности, в том, что длинные клетки псевдогиф и настоящих гиф труднее поддаются фагоцитозу. Влияние на резистентность макроорганизма мицелиальные формы *C. albicans* оказывают и на более высоком уровне иммунорегуляции. Установлено, что в отличие от бластоконидий гифы *C. albicans* не способствуют продукции интерлейкина-12 дендритными клетками человека и, следовательно, развитию защитной реакции типа Th-1. Мутанты по *cph1/cph1* и *efg1/efg1* не способны подавлять индукцию интерлейкина-12 мононуклеарны-

ми клетками крови человека, а восстановление EFG1 ведет к подавлению этого цитокина.

Известны гены *C. albicans*, экспрессия которых связана и с морфогенетическими механизмами, и с вирулентностью (табл. 41).

Так называемые фазоспецифичные факторы патогенности — это те молекулы, которые обнаруживаются только в определенной фазе диморфных грибов (классических возбудителей эндемических микозов — *C. albicans* и некоторых других). К генам подобных факторов у *C. albicans* относят, в частности, *ECE1*, *HWP1*, *ALS3* и *HYR1*, связанные с мицелиальной фазой.

Таблица 41. Некоторые гены *C. albicans*, ассоциированные с морфогенезом и вирулентностью (по P.J. Rooney, и B.S. Klein)

Ген	Белок или функция	Влияние экспрессии на образование гиф
<i>ALO1</i>	D-арабино-1,4-лактонооксидаза	Стимулирует
<i>CAP1</i>	Аденилатциклаза-ассоциированный белок	Стимулирует
<i>CHK1</i>	Гистидинкиназа	Стимулирует
<i>CPP1</i>	Cek1p (МАП-киназа) фосфатаза	Подавляет
<i>CRK1</i>	Cdc2-связанная киназа	Стимулирует
<i>EFG1</i>	Фактор транскрипции	Стимулирует
<i>HOG1</i>	МАП-киназа	Подавляет
<i>HWP1</i>	Белок клеточной стенки гифы	Стимулирует
<i>INT1</i>	Адгезин	Стимулирует
<i>LIG4</i>	ДНК-лигаза	Стимулирует
<i>NIK1</i>	Гистидинкиназа	Стимулирует
<i>PMT1</i>	Протеинманнозилтрансфераза	Стимулирует
<i>PMT6</i>	Протеинманнозилтрансфераза	Стимулирует
<i>RFG1</i>	Регулятор транскрипции	Подавляет
<i>RSR1</i>	Ras-связанный белок, выбор локуса почкования	Стимулирует
<i>SSK1</i>	Двухкомпонентный регулятор ответа	Стимулирует
<i>SLN1</i>	Гистидинкиназа	Стимулирует
<i>TEC1</i>	Фактор транскрипции	Стимулирует
<i>VPS34</i>	Фосфатидилинозитол-3-киназа	Стимулирует

Примечание. Взаимосвязь с вирулентностью оценена по свойствам соответствующих мутантов.

У классических диморфных возбудителей *H. capsulatum* и *B. dermatitidis* также выделены фазоспецифичные гены. У *H. capsulatum* найдены гены *YPS3* и *YPS21:E-9*, специфичные для патогенной (тканевой) дрожжевой фазы. Функция их продуктов не установлена. Третий из известных фазоспецифичных генов возбудителя гистоплазмоза, специфичный для дрожжевой фазы *CBP1* (кальцийсвязывающий белок), ассоциируется с вирулентностью. Мутанты, лишенные данного гена, не способны разрушать макрофаги *in vitro* и вызывать колонизацию легких у лабораторных животных.

У *B. dermatitidis*, возбудителя бластомикоза, найдены два гена, экспрессирующиеся только в дрожжевой фазе: *BYS1* (кодирует белок с мол. массой 19 кДа, с неизвестной функцией) и *BAD-1*. Последний ген кодирует известный иммунодоминантный белок WI-1. Он считается одним из главных факторов патогенности *B. dermatitidis*, участвующим в адгезии (адгезин/инвазин), и основным антигеном, вызывающим клеточные и гуморальные реакции. Это белок клеточной стенки с мол. массой 120 кДа. Он образуется только в дрожжевой фазе, что четко прослеживается при конверсии фаз. С помощью антигена WI-1 возбудитель связывается с макрофагами, а опсонизация блокирующими антителами к WI-1 препятствует адгезии. Клеточными рецепторами для антигена WI-1 являются CR-3 (CD11b/CD18) и CD14. Предполагается, что возбудитель способен регулировать экспрессию антигена WI-1 на своей поверхности, при необходимости наращивая его содержимое или, наоборот, избавляясь от него либо экранируя этот антиген другими молекулами. Это позволяет возбудителю не только проникать в ткани макроорганизма, но и избегать уничтожения. У африканских штаммов *B. dermatitidis* отсутствуют некоторые антигены классического американского возбудителя, в частности экзоантиген А, по строению близкий к WI-1. Штаммы-мутанты *bad1* не способны проникать внутрь макрофагов и вызывать активную инфекцию у лабораторных животных.

Фазоспецифичным геном возбудителя кокцидиодоза *C. immitis* является *SOWgp58*, экспрессируемый только тканевыми формами. Продукт данного гена считается адгезином.

У возбудителя криптококкоза *C. neoformans* генетические механизмы, регулирующие вирулентность, связывают с регуляцией как морфогенеза, так и полового цикла. Регуляторные системы включают и МАП-киназный, и протеинкиназный пути, а также кальциневринопосредованный механизм. Описанные элементы кальциневринопосредованный механизм. Описанные элементы протеинкиназного пути у *C. neoformans* включают GPA1 (G-белок), компонент цАМФ-системы, проводящий сигналы о содержании различных веществ за пределами клетки. Другой идентифицированный компонент, RAS1, может быть задействован и в МАП-киназной, и в цАМФ системах, способствуя их взаимо-

действию. Один из элементов G-белка, GBP1, участвует в проведении сигналов под действием феромонов при половом процессе. Взаимосвязь полового цикла и вирулентности, в частности, видят в том, что клетки МАТа-типа более вирулентны, чем клетки МАТa. Взаимосвязь с какими-то факторами вирулентности могут иметь некоторые элементы регуляторных систем, имеющиеся только в клетках МАТа-типа, например гомолог STE12 α — компонент МАП-киназной системы.

МАП-киназная система *C. neoformans* во многом охарактеризована. Одна из ранних стадий проведения сигнала (ответ на действие феромонов) зависит от субъединицы G-белка (ген *GPB1*). Мутанты *gpb1* стерильны и отличаются сниженной вирулентностью. В то же время усиленная экспрессия *GPB1* стимулирует половой морфогенез (вытягивание клеток). Возможно, что элементы GPA1 и GPB1 дополняют друг друга, представляя компоненты двух сигнальных систем, один из которых проводит сигналы внешней среды и реагирует на внеклеточную концентрацию питательных веществ, а другой принимает сигналы феромонов.

С цАМФ-системой *C. neoformans*, регулирующей процесс спаривания, связаны такие важные для вирулентности процессы, как образование капсулы и меланина. Мутанты *gpa1* отличаются дефектами спаривания и при этом неспособны образовать капсулу и вырабатывать меланин. Штаммы таких мутантов авирулентны в

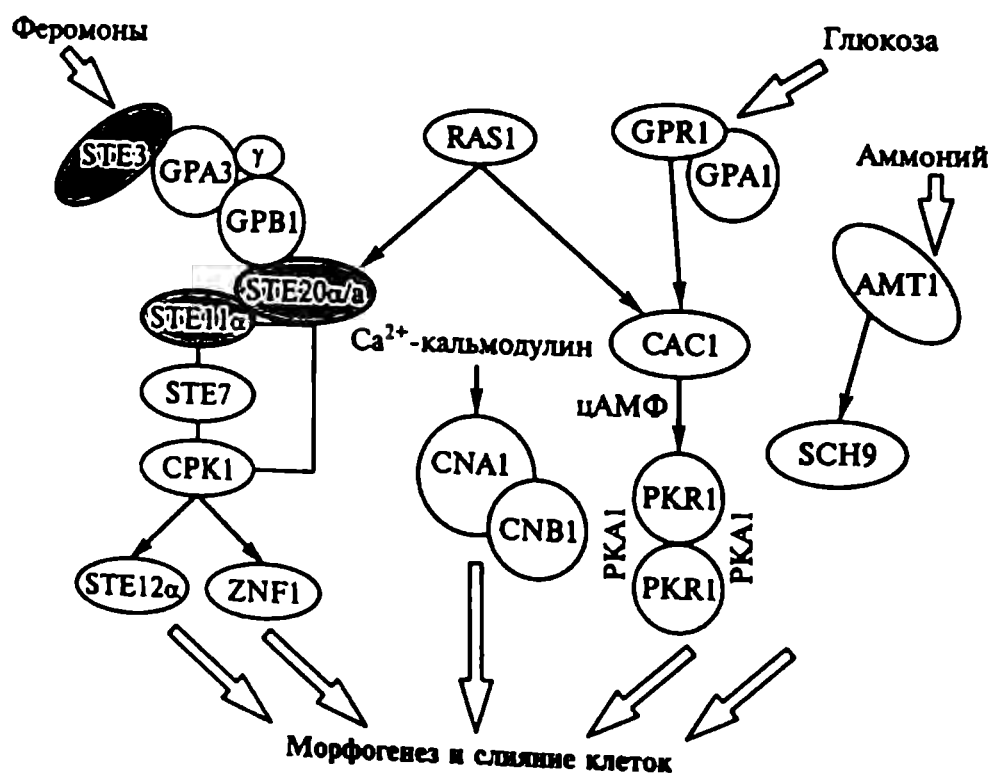


Рис. 87. Сигнальные системы, регулирующие половой цикл, морфогенез и вирулентность *C. neoformans* (K.B.Lengler et al., 2000)

модели криптококкового менингита. Экзогенный цАМФ подавляет фенотип мутантов *gra1*. Это может говорить о том, что цАМФ-путь регулирует образование капсулы и меланина — основных факторов патогенности *C. neoformans*.

Предполагаемая общая схема организации сигнальных систем, регулирующих половой цикл, морфогенез и вирулентность *C. neoformans*, представлена на рис. 87.

Эволюционные аспекты патогенности

Интерес к эволюционным аспектам патогенности может направлять специальные исследования, ставящие целью изучение развития тех или иных факторов агрессии или специализации грибов в отношении специфической ниши — макроорганизма. Однако эволюционные аспекты патогенности часто раскрываются в ходе текущих работ по геносистематике возбудителей микозов или геномных проектов, предусматривающих сопоставление геномов патогенных и непатогенных грибов с выделением специфичных генов. Еще одним источником данных могут стать исследования полового цикла развития известных патогенных грибов. Так, например, были получены свидетельства существования полового цикла развития у *C. albicans*, традиционно считавшегося бесполом организмом. После того как были установлены факты обмена ДНК и предположена генетическая рекомбинация, в геноме *C. albicans* были найдены гомологи локусов спаривания *S. cerevisiae* (MTL) и регуляторных генов. Были созданы комплементарные штаммы-гомозиготы (MTL α /MTL α и MTL α /MTL α) и осуществлен процесс спаривания, приведший к образованию тетраплоидов *in vivo*.

Значительный интерес представляет эволюция одних из немногих облигатно патогенных грибов, практически единственных возбудителей контагиозных микозов, имеющих строго антропофильных представителей — дерматофитов. Немногие виды дерматофитов поражают миллионы людей. Дерматофиты называют геофильными, зоофильными или антропофильными в зависимости от их обычной среды обитания — почвы, организма животных или человека. Члены всех трех групп могут вызывать заболевания человека, но их различные природные резервуары определяют эпидемиологические особенности — источник возбудителя, распространенность и географию ареалов. Хотя многие геофильные дерматофиты могут вызывать инфекцию и у животных, и у людей, наиболее привычной, естественной средой обитания этих грибов является почва. Члены зоофильной и антропофильной групп произошли, как считают, от этих и других населяющих почву сапрофитов, способных разрушать кератин. В ходе эво-

люции такие виды приспособились к новым специфическим хозяевам. Эти представления, как и существовавшая схема таксономии дерматофитов, были пересмотрены и осмыслены вновь в ходе недавних молекулярно-генетических исследований.

Было установлено, что некоторые виды дерматофитов, специфичные для определенных типов хозяев, оказались весьма близкими филогенетически к другим видам, довольно далеким от них фенотипически и имеющим других хозяев. Так, очень близкими оказались зоофильные виды с известной телеоморфой (сумчатой стадией) и заведомо бесполое антропофильные виды *Microsporum*.

Процесс эволюции дерматофитов сегодня представляется как формирование бесполой, слабо спорулирующих и обычно ауксотрофных линий с одинаковым типом спаривания. Эти линии формировались в процессе перехода от первичных хозяев — связанных с землей млекопитающих (грызуны, собачьи, кошачьи) к новым, не имеющим постоянной связи с почвой (человек, лошадь). Многие типичные для дерматофитов признаки: обильное конидиеобразование, аутотрофизм, гетероталличное спаривание, способность к перфорации волоса — могли сохраняться при сохранении одной экологической ниши — места обитания животного, где дерматофиты постоянно соприкасались с шерстью, чешуйками кожи и влажной почвой, подходящими условиями для полового размножения дерматофитов. По мере перехода к новым хозяевам, не имеющим постоянной связи с почвой, дерматофиты могли утрачивать способность к перфорации волоса и специфической кератинофилии, уреазную активность, интенсивное конидиеобразование и продукцию разных ростовых факторов. Наглядным примером могут служить лабораторные тесты, дифференцирующие такие виды, как *Trichophyton rubrum* и *T. mentagrophytes*, по неспособности первого перфорируют волос и разлагать мочевины.

Филогенетические исследования разных видов дерматофитов позволили сделать предположения относительно их происхождения и родства, выделить возможные направления эволюции и выбора хозяев. По-видимому, смена хозяина у таких видов, как *T. mentagrophytes* и близкородственные виды, произошла только один раз. Поэтому термины «антропофильный» и «зоофильный» следует применять к видам дерматофитов, а не отдельным штаммам.

Главный возбудитель дерматофитии человека, обуславливающий большую часть заболеваемости и колоссальные расходы на лечение в индустриально развитых странах, антропофильный вид *T. rubrum*, как оказалось, имеет строго клональный тип размножения. Никакого полиморфизма ДНК не было выявлено при изучении штаммов *T. rubrum*, выделенных на разных континентах от больных разными формами инфекции. Использование тех же ме-

тодов у *C. albicans* выявило 12 полиморфных локусов в 6 маркерах RAMD. На этом основании было сделано предположение, что генотип *T. rubrum* не изменился со времени его распространения из эндемичного района в Юго-Восточной Азии. Отсутствие генетического полиморфизма было отмечено также у других антропофильных *Trichophyton* (*T. tonsurans*, *T. mentagrophytes* var. *interdigitale*). Уникальная генетическая однородность дерматофитов может отражать их высокую специализацию в отношении хозяина, оправдывая облигатную патогенность и контагиозность дерматофитии.

ПРИЛОЖЕНИЕ

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НОМЕНКЛАТУРА ГРИБОВ (ПРИМЕРЫ) (из Trends in Genetics, 1998)

Ниже приведены обозначения генов и контролируемых ими белков у наиболее распространенных грибных генетических моделей.

Schizosaccharomyces pombe

(интернет-адрес <http://1112.bio.uva.nl/pombe/>);

Saccharomyces cerevisiae

(интернет-адрес <http://genome-www.stanford.edu/saccharomyces/>)

Общие положения

Символы генов: *arg1*, *leu2*, *cdc25*, *rad21*; аллели: одного локуса — *ade6-M26*, *ade6-469*, дикий тип — *arg*⁺ или ⁺; белки: Arg1, Leu2, Cdc25, Rad21 (или Arg1p...Rad21p); фенотипы: *arg*⁺, *arg*⁻ (*S. pombe*); Arg⁺, Arg⁻ (*S. cerevisiae*).

Детали

Гены. Комплементационные группы мультифункциональных генов:

- обозначаются заглавными буквами и номером локуса: *trp1A*;
- митохондриальные гены даются в квадратных скобках: [*cox1*]; у *S. cerevisiae* сохраняются и старые названия (*p*⁺, *p*⁻).

Аллели. Резистентности (чувствительности) к веществу, температуро(холодо)чувствительности — *can1-1 cdc2-5^u top2-250^{cs}*; супрессорных мутаций — *sup3-5* (дикий тип *sup3⁺*);

аллели, полученные в процессе технологий рекомбинантных ДНК — разрыв (disruption); интеграция :: делеция (-D) или (-del), или (-Δ); замещение (replacement) -r1 или -r2.

Пример. Разрыв *ade6* путем интеграции функционального гена *ura4⁺ ade6 ura4⁺* интеграция *ura4-1* на место *ade6* без разрыва последнего — *ade6 int :: ura4-1*.

Локусы спаривания. *S. pombe*: *mat1-M*, *mat1-P*; гены спаривания: *mat1-Pc*, *mat1-Pm*, *mat1-Mc*; типы спаривания: гомоталличный *h*⁹⁰, гетероталличные: +(h⁺N), -(h^{-S}). *S. cerevisiae*: MATa, MATα; гены спаривания: MATα1, MATα2.

Генотипы штаммов: гаплоидные — *h⁺ ade6-M26 arg1-230 res8-110*; диплоидные — *h⁺/h⁻ ade6-M25/ade6-469 arg1-230/+*; штаммы с плазмидой — *cdc22^u[pSUC22]*.

Обозначения хромосом: I, II, III; IL, IIR; cen (*S. pombe*), CEN (*S. cerevisiae*) — центромера, tel — теломера (cen1, cen2, tellR, tellIR).

Мобильные элементы: *S. pombe* — Tfi-107, Tf-2 (transposon of fission yeast); *S. cerevisiae* — YVRCty1-1, YIILWty5-1 (Y — yeast; V, II — номера хромосом; R, L — плечи хромосом; C ↔ W — направление транскрипции). Плазмиды: pFL20, pSU22.

Обозначения штаммов: PA11, GP833.

Aspergillus nidulans

(интернет-адрес <http://www.ibls.gla.ac.uk/Aaspergillus/index.html>)

Общие положения

Гены: *brlA*, *proA*, *proB*, *riboA*.

Аллели: *proA1*, *proA2*; мутантные аллели — *proA-1*, *proA-2*, *proB-3*; если локус не установлен — *pro99*; дикий тип — *proA*⁺

Белки: BRLA, PROA, RIBA.

Фенотипы: BrlA.

Детали

Гены: первый (A) и второй — (B) — идентифицированный ген соответственно и т.д.; *riboA*, *riboB*, *ribo C*.

Митохондриальные гены: [*camA*].

Аллели: *nirA1*^C (C — конститутивный).

Супрессоры: *suA1proA1* (при неизвестном аллеле — *suA1pro*); используют также трехбуквенное обозначение супрессоров — *smsA* (супрессор чувствительности к мутагенам).

Генотипы: группы сцепления — *proA1*, *biA1*, *pyroA4*; диплоиды — *proA1/+*; *+/pyroA1*.

Названия штаммов: FGSC4; GO51.

Neurospora crassa

(интернет-адрес <http://www.kumc.edu/research/fgsc/main.html>)

Общие положения

Гены: *tnr ace-1*, *ad-1*, *Bml* (доминантный), *leu-2*, *leu-3*.

Аллели: дикий тип — *leu-2*⁺, мутантные — *leu-1(33757)*, *leu-1(D221)*.

Белки: NMR, ACE-1, AD-1, LEU-2, LEU-3.

Фенотипы: leucine-requiring, benomyl-resistant.

Детали

Гены: митохондриальные — [*mi-3*]

Аллели: чувствительности — *cfs(OY305(s))*, *cyh^R*, *cyh^S*; супрессии (в скобках) — *su(met-7)*, *su(trp-5)*; аллели — *su(met-7)-1*.

Генотипы: *nit-2*, *leu-3*.

Хромосомы: I — VII (плечи IR IIIL).

Перестройки: T — транслокация; In — инверсия; Тр — транспозиция; Dp — дупликация: T(IIIR, VI)I — реципрокная транслокация; In(IL, IR) OY323; Тр(IR → IR) T54M94; Dp(VIIR-VL)AR33.

Обозначения штаммов: Lindegren 1A, 25a, o74OR-23-A1, Spurger-3, Spurger-7.

Транспозиция: транспозон Tad.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие

3

ЧАСТЬ I. ГРИБНОЙ ГЕНОМ И ПУТИ ЕГО ИЗМЕНЕНИЯ

Глава 1. Структура и организация генома грибов	8
Структура гена	14
Интроны	15
Классические ядерные интроны	18
Механизмы интеграции интронов и их происхождение	19
Реоорганизация генома. Структурные перестройки и модификации геномов	23
Транспозоны класса I	35
Транспозоны класса II	37
Участие транспозонов в патогенезе	44
Механизмы защиты от чрезмерных транспозиций и поддержание интегративной целостности геномов	45
Дупликации генов. Семейства генов. Псевдогены	48
Мобильные элементы митохондриальных геномов. Плазмиды	51
Линейные мт-плазмиды	54
Ковалентно замкнутые циклические мт-плазмиды	56
Вирусы	57
Ядерный статус грибов	58
Жизненный цикл грибов	59
Гетерокариоз	66
Глава 2. Мутации	68
Типы мутаций и факторы, их индуцирующие. Специфика отбора мутантов у грибов	68
Цитоплазматические мутации	74
Ядерные мутации	78
Направленный мутагенез (site-directed mutagenesis)	87
Инсерционный и делеционный мутагенез	90
Глава 3. Рекомбинации	92
Мейотическая, или половая, рекомбинация	96
Тетрадный анализ моногибридного скрещивания	100
Тетрадный анализ дигибридного скрещивания со сцепленными локусами	101
Интерференция	104

301

Дигибридный анализ несцепленных генов	105
Картирование генов	107
рес-Гены	108
Внутригенные рекомбинации	109
Конверсия генов	110
Основные закономерности процесса конверсии	117
Постмейотическая сегрегация	119
Ферментативный аппарат, обеспечивающий конверсию и рекомбинацию	121
Митотическая рекомбинация	124
Получение гетерокарионов	125
Получение диплоидов	125
Соматическая рекомбинация	128
Гаплоидизация	129
Нерасхождение хромосом	132
Митотический кроссинговер	133
Картирование	135

ЧАСТЬ II. ГЕНЕТИКА РАЗВИТИЯ

Глава 4. Бесполой цикл	139
Генетический контроль дрожжевого роста	139
Генетический контроль мицелиального роста	143
Прораствание спор	143
Вегетативный рост колонии	144
Спорообразование	147
Зигомицеты	148
Аскомицеты	149
Таллические конидии	149
Бластические конидии	151
Циркадные ритмы	158
Мицелиально-дрожжевой диморфизм	161
Возраст и старение	163
Глава 5. Генетика полового цикла	166
Морфологический гетероталлизм	168
Физиологический гетероталлизм. Димиксис	169
Регуляция полового процесса у аскомицетных дрожжей	169
Жизненный цикл и переключения типов спаривания	169
Структура факторов спаривания	171
Альфа- и а-специфичные гены и их продукты	172
Гены и их продукты, функционирующие в диплоидных клетках	174
Регуляция полового процесса у мицелиальных аскомицетов	176
Локусы спаривания	176
Генетическая регуляция плодообразования	179
Диафоромиксис	181
Классическая генетика	181
Молекулярная генетика	186
<i>Schizophyllum commune</i> и <i>Coprinus cinereus</i>	187

Ustilago maydis	190
Генетическая регуляция плодообразования	193

ЧАСТЬ III. НЕКОТОРЫЕ ВОПРОСЫ ГЕНЕТИКИ ПОПУЛЯЦИЙ И ЭВОЛЮЦИИ ГРИБОВ

Глава 6. Эволюция систем размножения	196
Увеличение рекомбинации	199
Снижение рекомбинации	201
Экологическая роль систем размножения	206
Глава 7. Гетерокариоз и вегетативная несовместимость	210
Гетерокариоз	210
Вегетативная несовместимость	212
Генетика вегетативной несовместимости	212
Экологическая и популяционная роль вегетативной несовместимости	216

ЧАСТЬ IV. ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ ГЕНЕТИКИ ГРИБОВ

Глава 8. Генетические основы селекции грибов	218
Селекция продуцентов грибных метаболитов	218
Первичные метаболиты	219
Регуляция синтеза	219
Примеры генетической регуляции метаболизма у грибов	220
Селекция	229
Вторичные метаболиты	232
Регуляция синтеза	232
Пенициллины и цефалоспорины	232
Селекция	236
Генетические основы селекции съедобных грибов	238
Оценки изменчивости	239
Использование природной изменчивости	244
Мутагенез	244
Рекомбинация	245
Половая гибридизация	246
Вегетативная гибридизация	250
Генетическая инженерия	250
Глава 9. Генетика патогенности фитопатогенных грибов	253
Генетика патогенности	254
Вирулентность	254
Агрессивность	258
Генетические системы, участвующие в патологическом процессе	258
Рост гифы на поверхности растения	259
Трансдукция сигнала	259
Формирование инфекционных структур	261
Деградация растительных покровов	264
	303

Подавление защитного потенциала растений	267
Умерщвление клеток хозяина	267
Подавление защитного потенциала клеток	270
Детоксикация активных форм кислорода	271
Детоксикация токсических веществ растений	271
Глава 10. Генетика патогенности возбудителей микозов	274
Современные направления исследований генетики грибов, имеющих значение для медицины	274
Исследования генома <i>Candida albicans</i>	275
Исследования генома <i>Aspergillus fumigatus</i>	278
Исследования генома <i>Cryptococcus neoformans</i>	280
Перспективы постгеномных исследований	281
Генетика патогенности возбудителей микозов	283
Генетические детерминанты патогенности возбудителей микозов	284
Генетика грибов и регуляция патогенности	288
Эволюционные аспекты патогенности	295
Приложение	298

Учебное издание

**Дьяков Юрий Таричанович,
Шнырева Алла Викторовна,
Сергеев Алексей Юрьевич**

Введение в генетику грибов

Учебное пособие

Редактор Г. Г. Есакова

Технический редактор Н. И. Горбачева

Компьютерная верстка: Л. А. Смирнова

Корректоры В. А. Жилкина, Г. Н. Петрова, Н. В. Савельева

Диапозитивы предоставлены издательством

Изд. № А-1301-1. Подписано в печать 25.05.2005. Формат 60 × 90/16.

Гарнитура «Таймс». Бумага тип. № 2. Печать офсетная. Усл. печ. л. 19,0.

Тираж 2000 экз. Заказ № 14892.

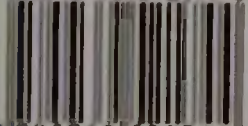
Издательский центр «Академия».

Санитарно-эпидемиологическое заключение № 77.99.02.953.Д.004796.07.04 от 20.07.2004.
117342, Москва, ул. Бутлерова, 17-Б, к. 360. Тел./факс: (095) 334-8337, 330-1092.

Отпечатано в ОАО «Саратовский полиграфический комбинат»
410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 59.

ВВЕДЕНИЕ В ГЕНЕТИКУ ГРИБОВ

ISBN 5-7695-2174-0



9 785769 521744

Издательский центр «Академия»